

Aus der Klinik für Innere Medizin IV, Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
(Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Kunzendorf)  
und der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie, II. Medizinische Klinik  
(Leitender Arzt: Prof. Dr. med. Martin Gramatzki)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNG DER ANTIKÖRPER-ABHÄNGIGEN ZELLULÄREN  
ZYTOTOXIZITÄT VON HUMANISIERTEN EGF-REZEPTOR-  
ANTI-KÖRPERN MIT OPTIMIERTEM ANTIKÖRPER-Fc-FRAGMENT  
GEGEN TUMORZELLEN MIT MUTIERTEM KRAS-PROTEIN**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**MARTIN SCHLAETH**

aus Parchim

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Valerius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Januar 2013

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 24. Januar 2013

gez. Prof. Dr. med. Johann Roider  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

Seite

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Glossar .....</b>	<b>VII</b>
<b>Vorbemerkung .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Der <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> .....	2
1.2 <i>HRAS</i> , <i>NRAS</i> und <i>KRAS</i> .....	4
1.3 Bedeutung des <i>EGF</i> -Rezeptors und der <i>RAS</i> -Proteine in der Biologie maligner Tumorerkrankungen .....	8
1.3.1 Das kolorektale Karzinom .....	8
1.3.2 Das Lungenkarzinom .....	9
1.4 Monoklonale Antikörper in der Medizin .....	12
1.4.1 Struktur und Funktion der Immunglobuline .....	12
1.4.2 Entwicklung und Herstellung monoklonaler Antikörper .....	15
1.4.3 Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper .....	17
1.4.4 Optimierung monoklonaler Antikörper .....	19
1.5 Fragestellung und Zielsetzung .....	20
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Verwendete Materialien .....	22
2.1.1 Stammmedien zur Kultivierung humaner Tumorzelllinien .....	22
2.1.2 Humane Tumorzelllinien .....	23
2.1.3 Primär- und Sekundärantikörper .....	23
2.2 Monoklonale Antikörper .....	24
2.2.1 Konstruktion und Herstellung der <i>EGFR</i> -Antikörpervarianten .....	24
2.2.2 Bestimmung der Bindungsaffinität zu humanen Fc gamma Rezeptoren .....	25
2.3 Kultivierung humaner Tumorzelllinien .....	25
2.4 Durchflusszytometrische Analyse .....	26
2.5 Nachweis von konstitutiv aktiviertem <i>RAS</i> .....	27
2.5.1 Präzipitation von <i>RAS</i> .....	27
2.5.2 Detektion des präzipitierten <i>RAS</i> mittels Western-Blot .....	28
2.6 Isolation humaner Leukozyten .....	28

2.6.1	Probengewinnung und -verarbeitung .....	28
2.6.2	Aufreinigung humaner Leukozyten über Percoll-Dichtegradienten.....	29
2.7	Zytotoxizitätstests .....	29
2.8	Untersuchung des Tumorzellwachstums (MTS-Assay).....	30
2.9	Statistische Auswertung.....	31
2.9.1	Darstellung der Ergebnisse.....	31
2.9.2	Statistische Analyse.....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1	Auswahl und Charakterisierung der verwendeten Zelllinien .....	33
3.2	Charakterisierung der <i>EGFR</i> -Antikörpervarianten.....	34
3.2.1	Bestimmung der Affinität zu humanen $Fc\gamma$ Rezeptoren.....	35
3.2.2	Charakterisierung Fab-vermittelter Wirkmechanismen.....	36
3.2.3	Charakterisierung Fc-vermittelter Wirkmechanismen.....	38
3.3	Wirkung humanisierter IgG1 <i>EGFR</i> -Antikörper auf Tumorzelllinien mit Mutation des <i>KRAS</i> Proteins .....	40
3.3.1	Vergleich direkter und indirekter Wirkmechanismen .....	40
3.3.2	Einfluss des <i>Fc-Engineering</i> auf den ADCC von Tumorzellen mit mutiertem, konstitutiv aktivem <i>KRAS</i> .....	42
3.3.3	MNC-vermittelte Antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität in Abhängigkeit vom $Fc\gamma RIIIa$ -158V/F-Polymorphismus .....	45
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>47</b>
4.1	Auswahl und Charakterisierung der untersuchten Zelllinien .....	47
4.2	Charakterisierung der <i>EGFR</i> -Antikörpervarianten.....	49
4.3	Wirksamkeit humanisierter IgG1 <i>EGFR</i> -Antikörper gegen CRC- und NSCLC- Zelllinien mit <i>KRAS</i> -Mutation .....	51
4.3.1	Vergleich direkter und indirekter Wirkmechanismen .....	51
4.3.2	Einfluss des <i>Fc-Engineering</i> auf den ADCC von <i>KRAS</i> -mutierten CRC- und NSCLC-Zelllinien .....	52
4.3.3	MNC-vermittelte Antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität in Abhängigkeit vom $Fc\gamma RIIIa$ -158V/F-Polymorphismus .....	53
4.4	Schlussfolgerung .....	55
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>56</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>67</b>

A.1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	67
A.2	Verbrauchsmaterialien .....	68
A.3	Technische Gerätschaften .....	69
<b>Danksagung.....</b>		<b>70</b>
<b>Lebenslauf .....</b>		<b>71</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ADCC</b>	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
<b>ADCP</b>	Antibody-dependent cellular phagocytosis
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>Asn</b>	Asparagin (Symbol nach IUPAC-Nomenklatur)
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>Bq</b>	Becquerel (SI-Einheit: $1 \text{ Bq} = 1 \text{ s}^{-1}$ )
<b>BRAF</b>	B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>Cbl</b>	Casitas B-lineage Lymphoma
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CDC</b>	Complement-dependent cytotoxicity
<b>CDR</b>	Complementarity-determining region
<b>Ci</b>	Curie (alte Einheit für Aktivität, $1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$ )
<b><sup>51</sup>Cr</b>	Chrom-51
<b>CRC</b>	Colorectal cancer
<b>D</b>	Aspartat (1-Buchstabencode nach IUPAC-Nomenklatur)
<b>Da</b>	Dalton; Maßeinheit für das Molekulargewicht
<b>DAG</b>	1,2-Diacylglycerol
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<b>E</b>	Glutamat (1-Buchstabencode nach IUPAC-Nomenklatur)
<b>EC<sub>50</sub></b>	mittlere effektive Konzentration
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Rezeptor
<b>ERK</b>	Extracellular-signal regulated Kinase
<b>E:T-Ratio</b>	Effektor-zu-Targetzell-Verhältnis
<b>Fab-Fragment</b>	antigenbindendes Fragment
<b>FACS<sup>TM</sup></b>	Fluorescence Activated Cell Sorting
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum; Fötales Rinderserum
<b>Fc-Fragment</b>	fragment crystalline
<b>Fc<math>\gamma</math>R</b>	Fc gamma Rezeptor

FcR	Fc Rezeptor
FITC	Fluoresceinisoithiocyanat
<b>g</b>	Gramm
Gab	Grb2-associated binding protein
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
ggf.	gegebenenfalls
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GNEF	Guanine nukleotide exchange factor
Grb2	Growth-factor-receptor-bound-2 protein
GTP	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	human (Präfix)
HB-EGF	Heparin-binding Epidermal Growth Factor
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
<b>I</b>	Isoleucin (1-Buchstabencode nach IUPAC-Nomenklatur)
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,3,5-triphosphat
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>k</b>	Kilo-
K <sub>A</sub>	Affinitätskonstante, Maßeinheit: Mol
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante, Maßeinheit: Mol
95 % KI	95 % Konfidenzintervall
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog protein
<b>L</b>	Liter
<b>M</b>	Molar oder Mega-
m	Milli-; murin (Präfix)
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MEK	Mitogen-activated Extracellular-signal Regulated Kinase Kinase
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MNC	Mononuclear cell
mol	Mol
Mw	Molecular weight
MW	Mittelwert
<b>n</b>	Nano-

NGF	Nerve Growth Factor
NRG	Neuregulin
NSCLC	Non-small cell lung cancer
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaktion
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI3KCA	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha-polypeptide
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMN	Polymorphnuclear cell = Granulozyten
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog, Enzym eukaryotischer Zellen
<b>Raf</b>	Ras-activated factor
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
<b>S</b>	Serin (1-Buchstabencode nach IUPAC-Nomenklatur)
SAPK	Stress-activated protein kinase
SEM	Standard Error of the Mean
Shc	Src-homology-2-containing
SHP2	SH2-containing tyrosine phosphatase
SOS	Son-of-sevenless, ein zelluläres Signalprotein
STAT	Signal transducer and activator of transcription
<b>Tab.</b>	Tabelle
TGF $\alpha$	Transforming Growth Factor alpha
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
<b>u. a.</b>	unter anderem; und andere
<b>v/v</b>	volume per volume
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>w/v</b>	weight per volume
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b><math>\mu</math></b>	Mikro-



## Glossar

<i>Assay</i>	Englisches Wort für Test, Untersuchung oder Probe.
<i>Fc-Engineering</i>	Anglizismus aus der naturwissenschaftlichen und biomedizinischen Forschung, der die molekularbiologische Veränderung der Proteinstruktur ( <i>protein-engineering</i> ) bzw. der Glykosylierung ( <i>glyco-engineering</i> ) des Fc-Fragments von Antikörpern bezeichnet.
<i>Mononuclear Cells</i>	Aus dem Englischen für die Zellfraktion der Lymphozyten und Monozyten des menschlichen Bluts, aufgrund ihres einzelnen, meist großen Zellkerns. Abkürzung: MNC
<i>Polymorphonuclear Cells</i>	Aus dem Englischen für die Zellfraktion der Neutro-, Baso- und Eosinophilen Granulozyten des menschlichen Bluts, aufgrund ihres meist segmentierten Zellkerns. Abkürzung: PMN
<i>Wildtyp</i>	Erscheinungsform eines Organismus oder einer biologisch aktiven Verbindung, wie sie natürlicherweise am Häufigsten vorkommt.

## Vorbemerkung

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sind teilweise Bestandteil nachfolgender Publikationen:

- **Schlaeth, M.**, S. Berger, S. Derer, S., Klausz, K., Lohse, S., Dechant, M., Lazar, G. A., Schneider-Merck, T., Peipp, M. & Valerius, T. Fc engineered EGF-R antibodies mediate improved antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against *KRAS*-mutated tumor cells. *Cancer Sci* 2010; 101: 1080-1088
- Derer, S., **M. Schlaeth**, S. Berger, S. Lohse, M. Dechant, G. A. Lazar, M. Peipp, and T. Valerius, *Impact of oncogenic KRAS on effector mechanisms of antibodies direct against the EGF-R*, in *32nd Symposium of the North-German Immunologists*. 2009: Research Center Borstel, Germany. (Posterbeitrag)

# 1 Einleitung

Mit einer geschätzten Inzidenz von ca. 70 bzw. 50 Neuerkrankungsfällen pro hunderttausend Einwohner im Jahr 2008 gehören das kolorektale Karzinom bzw. das Lungenkarzinom zu den häufigsten Krebserkrankungen beiderlei Geschlechts in Westeuropa (1). Die Optimierung von Prävention, Früherkennung und Therapie dieser Erkrankungen genießen daher einen sehr hohen Stellenwert, wie sowohl die Reduktion der Neuerkrankungsfälle als auch der Rückgang der Sterblichkeit in einigen Regionen Europas und der Welt belegen (1). Lange Zeit waren Radiatio und chirurgische Tumorentfernung die einzigen Therapieoptionen. Erst die Entwicklung der ersten chemisch definierten Medikamente Ende der 1960er Jahre, die in die Mitogenese sich schnell teilender, maligne entarteter Zellen eingriffen, ließen die Hoffnung auf Heilung maligner Tumorerkrankungen aufkeimen (2). Seit dieser Zeit wurden zur Krebstherapie eine Vielzahl von neuen Arzneimitteln und Therapieansätzen entwickelt, die ab 1990 einen zum Teil spürbaren Rückgang der Krebsmortalität herbeiführten (2). Eine der aktuellsten Entwicklungen ist die sogenannte molekulare zielgerichtete Therapie, zu der unter anderen auch die monoklonalen Antikörper gehören. Diese richten sich gegen Antigene, die idealerweise überwiegend auf der Oberfläche von maligne transformierten Zellen exprimiert werden (3). Eines dieser Antigene ist der *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)*, der auf circa einem Drittel aller soliden Tumore überexprimiert wird und als Rezeptor für Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Tumore spielt (4). Aktuell sind zwei monoklonale *EGFR*-Antikörper, Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) und Panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>), für die Therapie solider Tumoren zugelassen. Ihre Hauptanwendung finden sie im Rahmen der Therapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms (5). Cetuximab wird darüber hinaus in klinischen Studien gegen das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom erprobt (6) und wurde ferner für die Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich zugelassen (7). Ein weiterer *EGFR*-Antikörper, Nimotuzumab, der ein günstigeres Nebenwirkungsprofil aufweisen soll, befindet sich derzeit in klinischer Erprobung. In einigen Ländern Osteuropas, Asiens sowie Afrikas und von Südamerika ist Nimotuzumab bereits für Plattenepithelkarzinome des Nasopharynx sowie das Glioblastom zugelassen. In Europa und den USA besitzt dieser Antikörper den sogenannten „*orphan drug*“-Status als Arzneimittel gegen seltene Erkrankungen (8).

Die klinische Antitumorwirkung dieser auch als *Biologicals* bezeichneten Substanzen geht auf eine Reihe von Wirkmechanismen zurück, die sowohl eine direkte Beeinflussung biologischer Signalwege als auch eine Interaktion mit dem Immunsystem des Patienten beinhalten

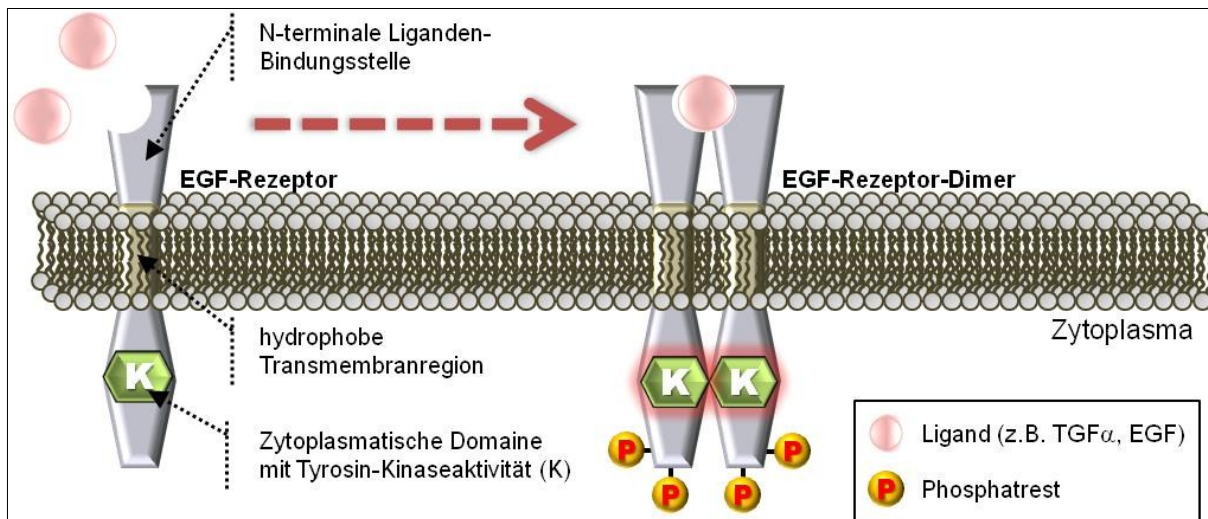
(9). Darüber hinaus ist die Wirkung dieser Antikörper allem Anschein nach von weiteren Faktoren abhängig, die sich mit zunehmendem klinischem Einsatz herausstellen. Hierzu gehören zum Einen genetische Veränderungen der Tumorzellen, die zu einem Wirkverlust der Antikörper führen können und zum Anderen die immunologische Ausstattung des Patienten (10). Im wissenschaftlichen Interesse stehen daher aktuell intrazelluläre Moleküle (z.B. *KRAS*, *BRAF*, *PI3K*), die an der Signaltransduktion des *EGF*-Rezeptors beteiligt sind und sich teilweise als prognostische Marker für die Therapie mit *EGFR*-Antikörpern herausgestellt haben (11). Ferner hat sich gezeigt, dass bestimmte genetische Polymorphismen der *Fcγ*-Rezeptoren ebenfalls einen Einfluss auf den therapeutischen Nutzen von Antikörpern haben (12). Daher wird intensiv an der Entwicklung neuer Antikörpermoleküle gearbeitet, um die immunologische Antitumorwirkung weiter zu erhöhen und den Einfluss genetischer Faktoren zu minimieren (13).

## 1.1 Der *Epidermal Growth Factor Receptor*

Der *Epidermal Growth Factor Receptor* (*EGFR*, HER1 oder ErbB1) wurde erstmals 1980 von Cohen *et al.* beschrieben (14). Er ist ein membranständiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von circa 170 kDa und gehört zur Familie der Typ-I-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Weitere Vertreter dieser strukturell nahezu identischen Proteinfamilie sind der HER2/*neu*- (ErbB2), HER3- (ErbB3) und HER4-Rezeptor (ErbB4). Strukturell bestehen sie aus der extrazellulären Liganden-Bindungsstelle, einer hydrophoben Transmembranregion sowie einer zytoplasmatischen Domäne mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität (**Abb. 1-1**). Zudem finden sich in der zytoplasmatischen Domäne Tyrosinreste, die bei Aktivierung des Rezeptors mithilfe der Tyrosinkinase phosphoryliert werden und in diesem Zustand ihrerseits eine Bindungsstelle für Adaptermoleküle der zellulären Signalkaskade darstellen (15).

Zur Aktivierung des Rezeptors ist die Bindung eines seiner Liganden erforderlich, von denen bislang 13 verschiedene identifiziert wurden (16). Allein sechs Liganden binden spezifisch am *EGF*-Rezeptor und sind namentlich der Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor alpha ( $TGF\alpha$ ), das Amphiregulin, Heparin-binding EGF (HB-EGF),  $\beta$ -Cellulin sowie Epiregulin (5). Ferner werden in der Literatur die Neureguline (NRG's) als spezifische Liganden des HER3- und HER4-Rezeptors beschrieben sowie das Epigen als ein weiterer Ligand des *EGFR*. Lediglich für den HER2-Rezeptor sind bislang keine Liganden identifiziert worden (17). Nach Bindung des Liganden bilden die HER-Rezeptoren ein Dimer, das entweder als Homo- oder Heterodimer entsteht. Da HER2 keine spezifischen Liganden besitzt und der HER3-Rezeptor keine Tyrosinkinaseaktivität, sind diese beiden in der Regel Co-Rezeptoren eines Heterodimers, obgleich beide Rezeptoren zur Entstehung potenter zellulärer Signale beitragen können (16). Die Homo- bzw. Heterodimerisierung von HER-

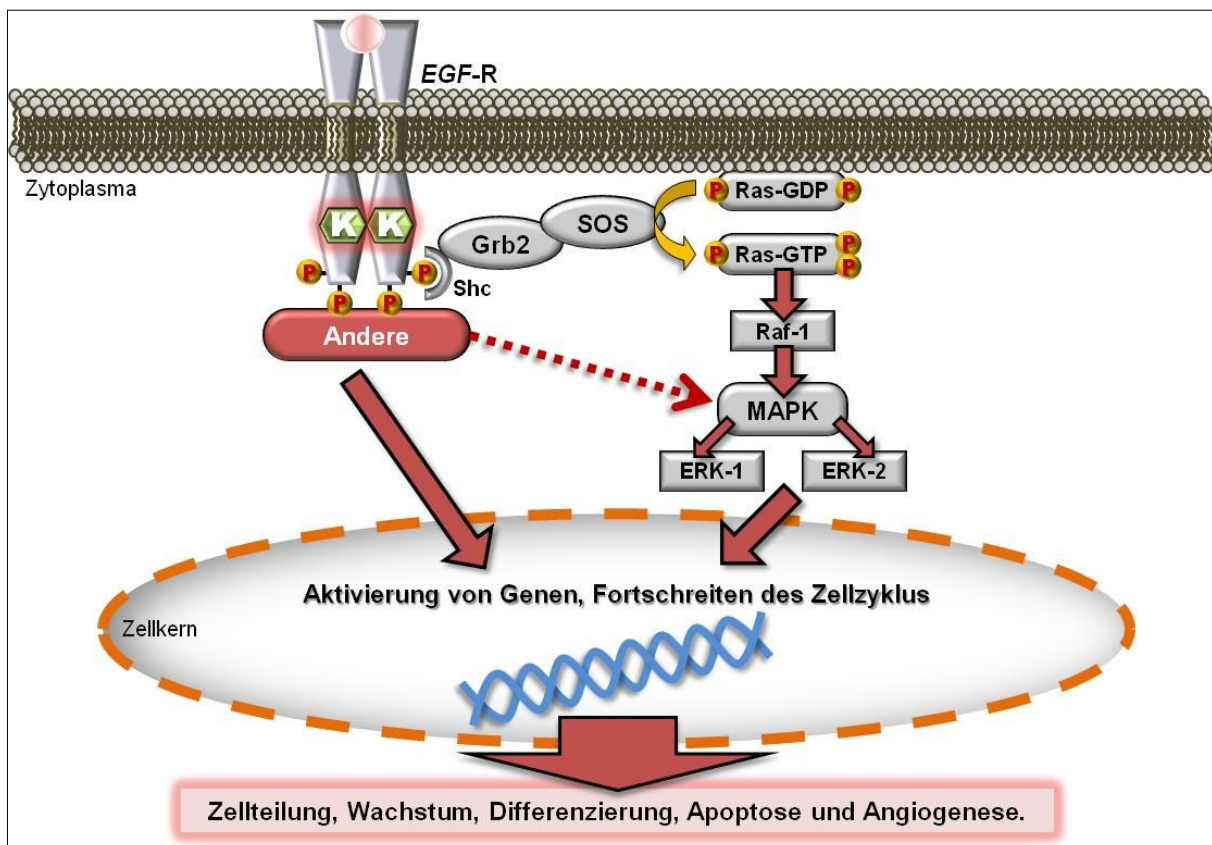
Rezeptoren führt zur Autophosphorylisierung der Tyrosinreste am C-terminalen Ende der intrazellulär gelegenen Tyrosinkinasedomäne (**Abb. 1-1**). Ferner entscheidet die Zusammensetzung der Rezeptordimere über deren weiteres Schicksal. So werden *EGFR*-Homo- bzw. Heterodimere beispielsweise bevorzugt endozytiert und lysosomal abgebaut, während Heterodimere, die den HER2- bzw. HER3-Rezeptor beinhalten, häufig an die Zelloberfläche rezirkulieren (15).



**Abbildung 1-1. Vereinfachte schematische Darstellung des EGF-Rezeptors.** Bindet ein Ligand an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, kommt es zur Ausbildung eines Dimers (Pfeil).

Durch die Ligandenabhängige Aktivierung des *EGF*-Rezeptors werden im Wesentlichen drei zelluläre Signalkaskaden initiiert (18), von denen der Ras/Raf/Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-Pfad, durch den Zellteilung und Überleben gesteuert werden, ein wichtiger Signalweg für eukaryotische Zellen ist (19). Hierzu bindet nach Phosphorylisierung des Rezeptors ein Komplex aus den Adapterproteinen Growth-factor-receptor-bound-2 (Grb2) und Son-of-Sevenless (SOS) direkt oder über die Assoziation mit dem Adaptermolekül Src-homology-2-containing (Shc) an spezifische Bindungsstellen des Rezeptors und aktiviert das Ras-Protein (16). Die Ras-Aktivierung wiederum bewirkt eine Phosphorylierungskaskade in deren Folge über die MAP-Kinase die Extracellular-signal regulated Kinasen ERK-1 und ERK-2 aktiviert werden (**Abb. 1-2**). Diese translozieren in den Zellkern und steuern dort Transkriptionsfaktoren, die in die Regulation der Zellteilung involviert sind (20). Ein weiterer Pfad ist die Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase Akt durch die Phosphatidyl-inositol-3-Kinase (PI3K). *PI3K* ist ein Enzym, das die Bildung des Second-Messengers Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat katalysiert, das wiederum eine Phosphorylierung von Akt bewirkt. Akt aktiviert seinerseits im Zellkern Transkriptionsfaktoren durch die Zellwachstum sowie Apoptoseresistenz, Invasion und Migration von Zellen gesteuert werden (21). Der *PI3K*/Akt-

Pfad wird überwiegend durch *EGFR/HER3*-Heterodimere aktiviert, da dem *EGF*-Rezeptor eine entsprechende Bindungsstelle für die PI3-Kinase fehlt (20). Einen dritten bedeutenden intrazellulären Signalweg stellt die Interaktion mit der Phospholipase  $C_\gamma$  ( $PLC_\gamma$ ) dar, die Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat in Insositol-1,3,5-triphosphat ( $IP_3$ ) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert (22). Während  $IP_3$  an der Regulation der zellulären Calcium-Homöostase beteiligt ist, dient DAG als Co-Faktor bei der Aktivierung der Protein Kinase C. Diese kann wiederum die MAP-Kinase aktivieren und stellt somit eine Vernetzung zum Ras/Raf/MAP-Kinase-Signalweg dar (20).

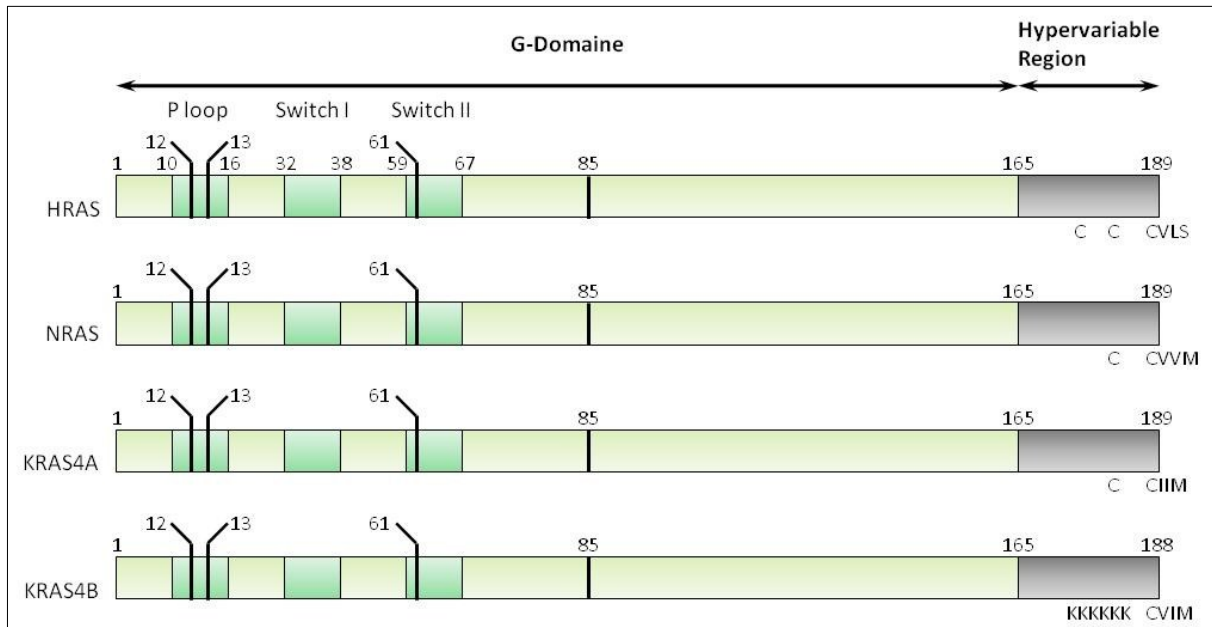


**Abbildung 1-2. Vereinfachte schematische Darstellung der Epidermal Growth Factor Rezeptor Signalkaskade.** Eigene Darstellung, modifiziert nach (23).

## 1.2 *HRAS*, *NRAS* und *KRAS*

Die *RAS*-Proteine sind kleine GTP-bindende Proteine, die der nach ihnen benannten Superfamilie der *RAS*-ähnlichen GTPasen angehören. Auf zellulärer Ebene sind diese in die Kontrolle von Signalwegen involviert, die Wachstum, Migration, Differenzierung und andere zelluläre Zustände steuern. Ihre Aktivierung erfolgt vor allem über extrazelluläre Stimuli, die insbesondere von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren ausgehen (24). Welchen biologischen Effekt diese Stimuli dabei auf die Zelle ausüben hängt im Wesentlichen von der Sig-

nalkaskade ab, die eine *RAS*-Aktivierung nach sich zieht. So zeigten Untersuchungen mit der Tumorzelllinie PC-12, eines Phäochromozytoms der Nebennieren von Ratten, dass eine Stimulation mit *EGF* die Zellen zur Proliferation anregte, während die Stimulation derselben Zellen mit dem *Nerve Growth Factor* eine *RAS*-abhängige Differenzierung induzierte (25).

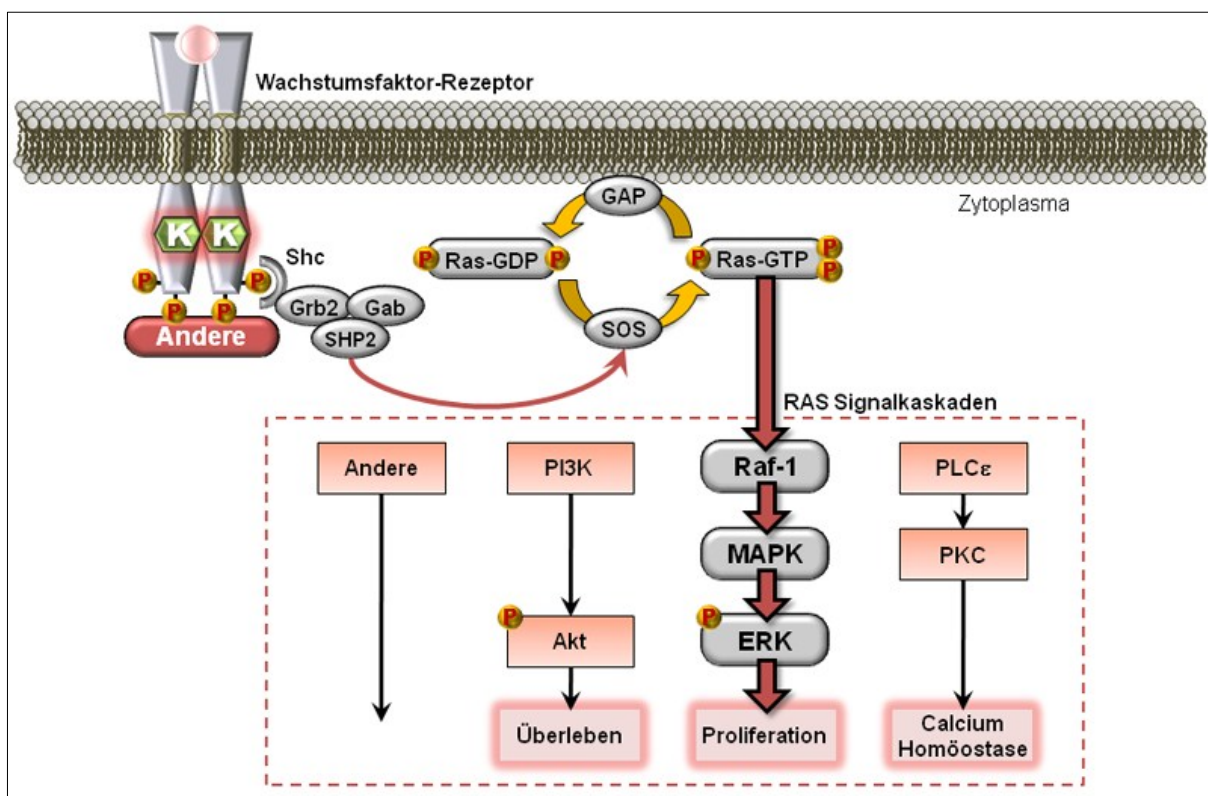


**Abbildung 1-3. Vereinfachte Schematische Darstellung der vier *RAS*-Isoformen.** HRAS, NRAS, KRAS4A und KRAS4B sind homologe Proteine aus 188 bzw. 189 Aminosäuren (AS) mit einem Molekulargewicht von insgesamt ca. 21 kDa, bestehend aus der G-Domäne (AS 1 – 165) und der Hypervariablen Region (AS 165 – 188/189). Die G-Domäne beinhaltet mit dem *P loop* (Phosphate binding loop, AS 10 – 16), dem Switch I (AS 32 – 38) und Switch II (AS 59 – 67) die Bindungsstellen für GDP und GTP sowie die Regulatoren und Effektoren von *RAS*. Die Aminosäuresequenz der G-Domäne ist für die AS 1 – 85 zu 100 % und für die AS 85 – 165 zu ca. 85 – 90 % in allen vier Proteinen identisch. Die Hypervariable Region bestimmt die Lokalisation der *RAS*-Proteine innerhalb der Plasmamembran. Hierzu werden die Proteine protranslational am sogenannten C-terminalen CAAX-Motif (CVLS, CVVM, CIIM und CVIM) mit Farnesylresten versehen. Während HRAS, NRAS und KRAS4A noch zusätzlich an spezifischen Cysteinen (C) palmitoyliert sind, besitzt KRAS4B eine sogenannte polybasische Region proximal des CVIM-Motifs, bestehend aus einer Abfolge der Aminosäure Lysin (K). Somatische *RAS*-Mutationen in Form von Aminosäuresubstitutionen werden in Tumorzellen am häufigsten an Aminosäureposition 12, 13 und 61 nachgewiesen (24, 26). Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Serin (S) und Valin (V). *Eigene Darstellung in Anlehnung an* (26).

Das menschliche Genom kodiert für drei *RAS*-Gene, deren genetische Information auf Proteinebene für vier verschiedene, homologe *RAS*-Proteine kodiert (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS4A* und *KRAS4B*). Diese gelten zudem als Protoonkogene und bestehen strukturell aus einer sogenannten G-Domäne und der hypervariablen Region. Die G-Domäne besteht aus einer hoch konservierten Sequenz von 165 Aminosäuren, die die Bindungsstellen für Guanosindiphosphat (GDP), Guanosintriphosphat (GTP) und die Regulatoren bzw. Effektoren vom *RAS* beinhaltet. Die hypervariable Region erstreckt sich von Aminosäure 165 bis 188/189 und bestimmt die posttranslationale Modifikation der einzelnen *RAS*-Proteine (26). *KRAS4A*



und *KRAS4B* sind Proteinisoformen, die durch alternatives Splicing während der Transkription der DNA in mRNA entstehen. Sie unterscheiden sich strukturell vor allem in der hypervariablen Region. Sowohl *KRAS4A* als auch *H-* und *NRAS* besitzen in dieser Region neben Farnesylresten einen weiteren Lipidanker aus Palmitylresten, die an bestimmte Cysteine der terminalen Aminosäuresequenz geknüpft sind und Einfluss auf den intrazellulären Transport über den Golgi-Apparat zur Zellmembran haben. *KRAS4B* hingegen besitzt anstelle dieser palmitoylierten Cysteine eine sogenannte „polybasische“ Region aus einer Abfolge der Aminosäure Lysin, die dessen Transport, vorbei am Golgi-Apparat, an seinen Platz in der Zellmembran bestimmt (**Abb. 1-3**) (24). Ferner stellt *KRAS4B* im Vergleich zu *KRAS4A* die weit- aus häufigere Splice-Variante dar und wird aufgrund dessen in der Literatur gemeinhin als *KRAS* bezeichnet (26).



**Abbildung 1-4. Vereinfachte schematische Darstellung der RAS-Signalkaskade.** Eigene Darstellung, modifiziert nach (26).

Unter physiologischen Bedingungen durchlaufen *RAS*-Proteine einen Aktivitätszyklus, der durch extrazelluläre Stimuli initiiert wird; jedoch auch unabhängig von diesen, in begrenztem Umfang spontan abläuft (26). Hierbei zirkuliert das *RAS*-Protein zwischen der GDP-gebundenen (*RAS*-GDP) inaktiven Form und der GTP-gebundenen (*RAS*-GTP) aktiven Form. Reguliert wird dieser Zyklus durch sogenannte Guanine Nucleotide Exchange Factors (GNEF's) und GTPase Activating Proteins (GAP's). GNEF's, wie z.B. die Mitglieder der SOS-



Familie, bewirken eine Dissoziation des GDP vom *RAS*-Protein, wodurch der Phosphate binding loop freigegeben wird. Da GTP in ca. zehnfach höherer Konzentration in der Zelle vorliegt als GDP, bindet dieses an *RAS* und bewirkt damit dessen Aktivierung (24). Die Inaktivierung wird durch die GAP's stimuliert, wodurch die GTPase-Aktivität von *RAS* um den Faktor Tausend und mehr gesteigert wird. Hierdurch kommt es zur Hydrolyse vom GTP zum GDP und einer konsekutiven Inaktivierung von *RAS* (24). Extrazelluläre Stimuli, beispielsweise durch Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, bewirken wie bereits erläutert eine *RAS*-Aktivierung. Durch die Liganden-Bindung kommt es am Rezeptor durch die Aktivierung von Signalvermittlerproteinen zur vermehrten Entstehung von *RAS*-GTP. Dies führt wiederum durch die Bindung unterschiedlicher Effektoren am aktivierten *RAS* zur Initiation einer zellulären Signalkaskade. In eukaryotischen Zellen ist ein zentraler Signalweg die Raf-MEK-ERK Kaskade, in die zudem zahlreiche andere Signalkaskaden einmünden (24, 26). *RAS*-GTP bindet mit hoher Affinität an die „Ras-binding domain“ (RBD) von Raf und bewirkt damit dessen Kinaseaktivierung. Die Proteinkinase Raf phosphoryliert Serin- bzw. Threoninreste der MAP-Kinasen MEK1 und 2, die wiederum durch Phosphorylierung die Extracellular signal-regulated Kinasen ERK1 und 2 aktivieren. Die ERK's sind wiederum in der Lage durch Phosphorylierung sowohl zytosolische als auch nukleäre Proteine zu aktivieren, die Zellteilung und -wachstum regulieren (**Abb. 1-4**) (26). Neben diesem Signalweg sind bis heute bereits mehr als zehn weitere Effektoren von *RAS* identifiziert worden (24), von denen hier weiterhin die Phosphatidylinositol-3 Kinase zu erwähnen ist. Sie wird durch die Bindung von *RAS*-GTP an ihrer katalytischen Untereinheit (PI3KCA) aktiviert und katalysiert die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat ( $\text{PIP}_3$ ).  $\text{PIP}_3$  ist in der Lage die Proteinkinase Akt zu aktivieren, die durch Phosphorylierung pro-apoptotischer Proteine im Zytosol und Nukleus, diese inaktiviert und damit die Zelle vor dem programmierten Zelltod schützt (26). Eine Dysregulation dieser Signaltransduktionskaskade durch *RAS*-Mutationen wird bei ca. 30 % der malignen Tumorerkrankungen beobachtet (26). Verantwortlich dafür sind missense-Mutationen im *RAS*-Gen, die häufig zu einer Substitution von Aminosäuren an Position 12, 13 und 61 des *RAS*-Proteins führen (24). In diesen Abschnitten befinden sich neben dem „phosphate binding loop“, der das  $\gamma$ -Phosphat des GTP bindet, die Bindungsstelle der GAP's. Diese verstärken die intrinsische GTPase-Aktivität der *RAS*-Proteine und damit die Hydrolyse des GTP zum GDP (vgl. **Abb. 1-3**). Infolge einer Mutation entsteht eine Resistenz gegenüber den GAP's, sodass das *RAS*-Protein im aktiven, GTP-gebundenen Zustand verharrt und unkontrolliert Signale ins Zellinnere weiterleitet (26).

### 1.3 Bedeutung des *EGF*-Rezeptors und der *RAS*-Proteine in der Biologie maligner Tumorerkrankungen

Grundsätzlich stellen sowohl der *EGFR* als auch die *RAS*-Proteine wichtige Instanzen der zellulären Signaltransduktion dar. Unter physiologischen Bedingungen sind sie durch die über sie ablaufenden Signalkaskaden in die Teilung, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen involviert. Maligne Tumoren überexprimieren häufig den *EGF*-Rezeptor und/oder weisen Mutationen der *RAS*-Proteine auf, wodurch ein aggressiverer Tumorphänotyp entsteht, der für die Patienten mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (16, 26). Eine Vielzahl von Tumorentitäten exprimieren den *EGF*-Rezeptor, darunter ca. 25 – 77 % aller kolorektalen Karzinome und ca. 40 – 80 % aller Lungenkarzinome (18), von denen wiederum ca. 30 % der kolorektalen Karzinome und ca. 20 % der Lungenkarzinome eine Mutation von *KRAS* aufweisen (26). Welche Bedeutung dies im Einzelnen für die betroffenen Patienten und deren Therapie hat, soll im Folgenden anhand der zuvor genannten Krankheitsbilder kurz betrachtet werden.

#### 1.3.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (CRC, Colorectal Carcinoma) ist in den Industrienationen die zweithäufigste Krebserkrankung beiderlei Geschlechts (1). Die Inzidenz für das CRC steigt bereits ab dem 35. Lebensjahr und verdoppelt bis vervierfacht sich zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr, wobei die kumulierte relative 5-Jahres-Überlebensrate bei rund 60 % liegt (27, 28). Das kolorektale Karzinom entsteht in der überwiegenden Anzahl der Fälle auf dem Boden gutartiger Schleimhautveränderung, den Adenomen (29). Diese Situation wird mit dem Begriff der Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet und beruht auf Beobachtungen des amerikanischen Arztes Bert Vogelstein (30). Die Ursachen der Karzinomentstehung sind dabei vielfältig und umfassen schlechte Ernährungsgewohnheiten (31), eine familiäre genetische Prädisposition (32) sowie chronisch entzündliche Darmerkrankungen (33).

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms hat in den vergangenen 15 Jahren durch die Einführung neuer chemotherapeutischer Substanzen eine Wende vollzogen, die sich vor allem im Anstieg des 5-Jahres-Überlebens, aber auch des Gesamtüberlebens niederschlägt (28, 34). Im Vordergrund der Therapie steht jedoch nachwievor ein chirurgisches Vorgehen mit möglichst vollständiger Tumorentfernung (35). Dies gelingt in Anbetracht des bei Diagnosestellung häufig fortgeschrittenen Tumorleidens jedoch selten (28), sodass sich weitere therapeutische Maßnahmen anschließen. Hierzu zählt neben der Strahlentherapie die medikamentöse Tumorthherapie (35).

In der medikamentösen Therapie des kolorektalen Karzinoms haben sich seit 2004 mit der Zulassung monoklonaler Antikörper neue zielgerichtete Therapieoptionen ergeben. Zu den ersten Substanzen dieser Klasse gehört neben Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) seit 2006 Panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>) (28). Beide monoklonalen Antikörper sind Antagonisten des *EGF*-Rezeptors. Sie beeinflussen das Tumorwachstum, indem sie die Liganden-abhängige Signaltransduktion des Rezeptors inhibieren. Ferner können sie Antikörper-abhängige Tumorzelllyse induzieren (28), ein Wirkmechanismus auf den weiter unten näher eingegangen werden wird.

Eine Einschränkung der zielgerichteten Therapie des CRC mit Cetuximab und Panitumumab stellt jedoch eine Mutation im Codon 12 bzw. 13 des *KRAS*-Gens dar. Retrospektive aber auch prospektive Subgruppenanalysen, bei denen die Wirksamkeit der *EGFR*-Antikörper gegen Tumoren mit Wildtyp-*KRAS*-Gen und mutiertem *KRAS* verglichen wurden, haben gezeigt, dass die Patienten deren Tumor eine Mutation von *KRAS* in Codon 12 bzw. 13 aufwiesen vom Einsatz der monoklonalen Antikörper nicht profitierten (36-39). Dies führte im Jahr 2009 zu der Empfehlung *EGFR*-Antikörper nur noch bei Patienten einzusetzen, deren Tumor einen *KRAS*-Wildtyp aufweist (40). Neben *KRAS* wurden noch weitere Biomarker identifiziert, die beim CRC einen prädiktiven Wert bezüglich des Therapieerfolgs haben. Zu erwähnen sind hier vor allem eine Mutation von *BRAF* (Prävalenz: 0 – 12,5 %), eine Mutation der katalytischen Untereinheit der *PI3K* (*PIK3CA*, Prävalenz: ca. 10 %) sowie ein Verlust der zum Tensin homologen Phosphatase *PTEN* (Prävalenz: ca. 30 %). Während sich das gleichzeitige Vorliegen einer *KRAS*- und *BRAF*-Mutation nahezu ausschließen (41), können Veränderungen der übrigen Biomarker im selben Tumor gleichzeitig vorliegen. Prognostisch wichtig ist dies vor allem für die Therapie mit den *EGF*-Rezeptor Antikörpern, da sowohl Mutationen von *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* oder der Verlust von *PTEN*, die allesamt dem *EGF*-Rezeptor nachgeschaltete Signalproteine sind, zu einer Autonomie der Tumorzelle führen. Die Entkoppelung vom Aktivitätszustand des *EGFR* führt zum Wachstumsfaktor-unabhängigen Wachstum der Tumorzellen und damit zum partiellen oder vollständigen Wirkverlust der *EGFR*-gerichteten Antikörpertherapien (11). Eine hohe Expression von *EGF*-Rezeptorliganden, wie z.B. Epiregulin und Amphiregulin, ist hinsichtlich der Antikörper-abhängigen Krankheitskontrolle dahingegen mit einer günstigen Prognose verbunden (42).

### 1.3.2 Das Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom stellt in der Bundesrepublik Deutschland die dritthäufigste Krebsdiagnose dar und zählt zur häufigsten Krebstodesursache bei Männern sowie zur Dritthäufigsten bei Frauen. Trotz verbesserter Diagnostik und Therapieoptionen ist die Prognose des Lungenkarzinoms mit einem durchschnittlichen 5-Jahresüberleben von 15 – 18 % als ungünstig zu bewerten (43).

Die Einteilung der primären Karzinome der Lunge erfolgt nach histologischen und klinischen Gesichtspunkten in das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC, Small Cell Lung Cancer), mit seinem Ursprung in epithelialen neuroendokrinen Zellen des Bronchialsystems, und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC, Non-small Cell Lung Cancer), das dem bronchioalveolären Epithel entstammt (44, 45). Darüber hinaus werden für das NSCLC weitere Subtypen unterschieden, von denen das Adeno- und Plattenepithelkarzinom sowie das großzellige Lungenkarzinom die häufigsten Entitäten darstellen (46). Ein weiterer Unterschied, insbesondere im Hinblick auf das therapeutische Vorgehen, ergibt sich aus dem biologischen Verhalten der Karzinome. Da das kleinzellige Lungenkarzinom schnell wächst und bereits frühzeitig metastasiert wird es primär mittels Chemotherapie und alternativ mittels Radiatio behandelt. Wohingegen bei den nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen im Frühstadium ein operatives Vorgehen im Vordergrund steht, sofern der Zustand des Patienten dies erlaubt. Die Therapie des fortgeschrittenen NSCLC erfolgt in der Regel medikamentös. Hierzu stehen neben den Platinhaltigen Substanzen (insbesondere Cis- und Carboplatin) weitere Zytostatika zur Verfügung, von denen das Pyrimidin-Analogon Gemcitabin sowie die Vinca-Alkaloide (z.B. Vincristin) und die Taxane (z.B. Paclitaxel) erwähnenswert sind (46). Seit einiger Zeit stehen zudem zwei weitere Substanzen, Erlotinib (Tarceva®) und Gefitinib (Iressa®), aus der Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) zur Therapie des NSCLC zur Verfügung (47).

Die TKI's Erlotinib und Gefitinib sind kleine Moleküle, deren chemische Struktur dem Adenosintriphosphat (ATP) ähnlich ist und die aufgrund ihrer Größe problemlos die Zellmembran passieren können. Intrazellulär inhibieren sie kompetitiv die Bindung vom ATP an dessen Bindungsstelle innerhalb der Tyrosinkinasedomäne des *EGF*-Rezeptors (19). Die Wirksamkeit der Tyrosinkinaseinhibitoren ist in besonderem Maße mit Mutationen des *EGFR*-Gens verbunden, die zu einer erhöhten Affinität der Tyrosinkinase zum ATP führen, wodurch es zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors und infolgedessen zur Liganden-unabhängigen Zellproliferation kommt (10, 47). Diese Mutationen, überwiegend eine Deletion von Exon 19 oder eine Punktmutation im Exon 21 (48), finden sich bei 10 % der amerikanischen bzw. 30–50 % der asiatischen Patienten mit einem Adenokarzinom. Darüber hinaus werden diese genetischen Veränderungen überwiegend bei Frauen und Nichtrauchern beobachtet und sind in dieser Patientengruppe – weiblich, Nichtraucher, asiatischen Ursprungs – mit einem exzellenten Therapieansprechen, einem längeren progressionsfreien Überleben sowie einer besseren Lebensqualität assoziiert (47, 49). Andere genetische Veränderungen beim NSCLC sind dagegen in der Regel mit einer schlechten Prognose verbunden. Hierzu zählen insbesondere aktivierende Mutationen von *KRAS* oder die „erworbene“ T790M-Mutationen, bei deren Nachweis Gefitinib und Erlotinib wirkungslos sind (49).

Ein weiteres Konzept der zielgerichteten Therapien beim NSCLC, stellt wie beim kolorektalen Karzinom der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen den *EGF*-Rezeptor dar. Die Erfahrungen mit diesen Therapeutika sind bisher jedoch begrenzt (10, 50). Im Jahre 2009 wurden die ersten Ergebnisse einer Phase III Studie mit 1.125 Patienten zum Einsatz des *EGFR*-Antikörpers Cetuximab (FLEX) zur Therapie des metastasierten NSCLC veröffentlicht. Hier wurde die herkömmliche Chemotherapie (Cisplatin und Vinorelbin) mit der zusätzlichen Gabe von Cetuximab verglichen. Gemessen am medianen Überleben ließ sich mit 11,3 Monaten vs. 10,1 Monaten ein kleiner, statistisch signifikanter Überlebensvorteil für die Patienten nachweisen, die zusätzlich mit Cetuximab behandelt wurden. Das längste mediane Gesamtüberleben, 12 Monaten im Cetuximab-Arm vs. 10,3 Monaten mit Chemotherapie allein, zeigte sich für Patienten mit einem histologisch nachgewiesenen Adenokarzinom (6). Weitere Veröffentlichungen über die Ergebnisse der BMS099-Studie stützen die bisherigen Erkenntnisse zum Nutzen von Cetuximab beim fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. In der randomisierten multizentrischen Phase III BMS099-Studie wurden sowohl das progressionsfreie Überleben (primärer Endpunkt) als auch das Gesamtansprechen, Gesamtüberleben sowie Lebensqualität und Therapiesicherheit (sekundäre Endpunkte) bei 676 Patienten mit einem unbehandelten fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC; UICC Stadium IIIB oder IV) untersucht. Hierzu wurden die Patienten mit einer Taxan/Carboplatin-haltigen Chemotherapie mit oder ohne Zugabe von Cetuximab in therapeutischer Dosierung behandelt. Es zeigten sich eine geringe, statistisch nicht signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens und ein statistisch signifikant verbessertes Gesamtansprechen der Patienten, die die Chemotherapie/Cetuximab-Kombination erhalten hatten (51). Dennoch konnten auch im Rahmen dieser Untersuchungen bisher keine Biomarker identifiziert werden, denen vor dem Hintergrund der hohen Therapiekosten für den Einsatz der Antikörper, eine prognostische Bedeutung in der Therapieplanung zukommen könnte (52). Während Mutationen des *KRAS*-Gens beim kolorektalen Karzinom mit einem schlechteren Ansprechen auf Cetuximab und Panitumumab sowie beim NSCLC auf Tyrosinkinaseinhibitoren verbunden sind, konnte dies für den Einsatz von Cetuximab beim NSCLC bisher weder in der FLEX- noch BMS099-Studie nachgewiesen werden (53, 54). Allerdings zeigen die Subgruppenanalysen der FLEX-Studie, dass eine hohe Expressionsrate des *EGF*-Rezeptors, bestimmt mittels Immunhistochemie, mit einem längeren Überleben verbunden war, wenn die Patienten zusätzlich mit Cetuximab behandelt wurden. Für Patienten, deren Tumor eine niedrige *EGFR*-Expression aufwies, zeigte sich hingegen kein Überlebensvorteil, auch wenn diese zusätzlich Cetuximab erhalten hatten (55). Hieraus schlussfolgern die Autoren, die *EGFR*-Expression auf NSCLC Tumoren zukünftig in die Entscheidung über eine Therapie mit *EGFR*-Antikörpern einzubeziehen.

## 1.4 Monoklonale Antikörper in der Medizin

Monoklonale Antikörper sind eine noch junge Substanzklasse in der Medizin, deren Entwicklungsgeschichte allerdings bis ins ausgehende 19. Jahrhundert und zu Paul Ehrlich, dem Autor des „Magic Bullet Concepts“, zurückreicht (56). Doch erst ein besseres Verständnis für die Struktur von Immunglobulinen (57) sowie die Entwicklung der Hybridom-Technik (58), die fortan eine Produktion monoklonaler Immunglobuline im größeren Maßstab ermöglichte, beschleunigten die Entwicklung monoklonaler Antikörper zur zielgerichteten Immuntherapie. Einen weiteren Meilenstein legte die moderne Gentechnologie, durch die Antikörper in industriellem Maßstab mit weitestgehend humanen Eigenschaften sowie verbesserter Affinität und Effektivität hergestellt werden können (13, 59). Aktuell sind fast ein Dutzend monoklonale Antikörper zur Therapie maligner Tumoren einschließlich der Leukämien zugelassen, ein noch größerer Teil gegen andere Erkrankungen sowie zu diagnostischen Zwecken, und ihre Zahl steigt stetig weiter (3, 60).

### 1.4.1 Struktur und Funktion der Immunglobuline

Antikörper bzw. Immunglobuline sind Glykoproteine mit einer Molekülmasse von ca. 150 kDa, deren struktureller Aufbau sich im Wesentlichen ähnelt. Beim Menschen werden fünf Hauptklassen von Immunglobulinen (Ig) unterschieden (IgG, IgA, IgM, IgD und IgE), von denen das IgG vier und das IgA zwei weitere Subklassen aufweisen (**Tab. 1-1**). Strukturell bestehen Antikörper aus zwei Paaren identischer Polypeptidketten, der schweren (engl. *heavy*; H) und der leichten (engl. *light*; L) Kette, die untereinander über Disulfidbrückenbindungen, zwischen zwei sich gegenüberliegenden Cysteinresten, verbunden sind. Sowohl die schweren als auch die leichten Ketten sind darüber hinaus in ca. 110 bis 130 Aminosäuren umfassende Domänen unterteilt (Immunglobulin-Domäne), innerhalb derer sich jeweils eine zylinderförmige Schleife ausbildet, die ebenfalls über kovalente Disulfidbrückenbindungen fixiert sind (**Abb. 1-5 B**). Am Aminoterminal des Ig-Moleküls findet sich jeweils die variable Domäne der schweren ( $V_H$ )- als auch der leichten Kette ( $V_L$ ), gefolgt von einer konstanten Domäne in Richtung des Carboxyterminus. Während die leichten Ketten jeweils nur eine konstante Domäne ( $C_L$ ) aufweisen, besitzen die schweren Ketten ( $C_H$ ) jeweils drei (IgG, IgA und IgD) bzw. vier (IgM und IgE) solcher Domänen (61). Die Bezeichnung der Polypeptidketten basiert auf ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht, das im Fall der leichten Kette (25 kDa) für alle Ig-Klassen nahezu identisch ist. Lediglich das Gewicht der schweren Kette (ca. 55 kDa) schwankt je nach Anzahl der variablen und konstanten Domänen. Darüber hinaus können zwei Typen von leichten Ketten unterschieden werden, die als Lambda ( $\lambda$ ) und Kappa ( $\kappa$ ) bezeichnet werden. Innerhalb eines Antikörpermoleküls findet sich jedoch entweder eine  $\lambda$ - oder eine  $\kappa$ -Leichtkette, wobei das Kappa-zu-Lambda-Verhältnis im menschlichen

Organismus ca. 2:1 beträgt. Im Gegensatz dazu werden für die schweren Ketten fünf verschiedene Typen ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ ) codiert und exprimiert, die sich sowohl strukturell als auch in ihrer Funktion zum Teil deutlich voneinander unterscheiden. Die schwere Kette, aus der ein Immunglobulin besteht, bestimmt dabei seinen *Isotyp* (**Tab. 1-1**) (62).

**Tabelle 1-1.** Übersicht der Immunglobulinisotypen und ihrer Eigenschaften (nach (62, 63))

Eigenschaften	Immunglobulin-Isotyp								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Schwere Kette	$\gamma_1$	$\gamma_2$	$\gamma_3$	$\gamma_4$	$\mu$	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\delta$	$\epsilon$
Struktur <sup>a</sup>	m	m	m	m	p	m/d	m/d	m	m
Molekulargewicht (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Serumspiegel (mg/ml)	9	3	1	0,5	1,5	3,0	0,5	0,03	$5 \times 10^{-5}$
Halbwertszeit im Serum (Tage)	21	20	7	21	10	6	6	3	2
Aktivierung des Komplementsystems <sup>b</sup>	K (++) A (-)	K (+) A (-)	K (+++) A (-)	K (-) A (-)	K (+++) A (-)	K (-) A (+)	K (-) A (-)	K (-) A (-)	K (-) A (-)
Plazentagängig	+++	+	++	- / +	-	-	-	-	-
Fc-Rezeptoren (FcR)	Fc $\gamma$ R I, II, III	Fc $\gamma$ R II	Fc $\gamma$ R I, II, III	Fc $\gamma$ R I, II		Fc $\alpha$ R	Fc $\alpha$ R	Fc $\delta$ R	Fc $\epsilon$ R I, II

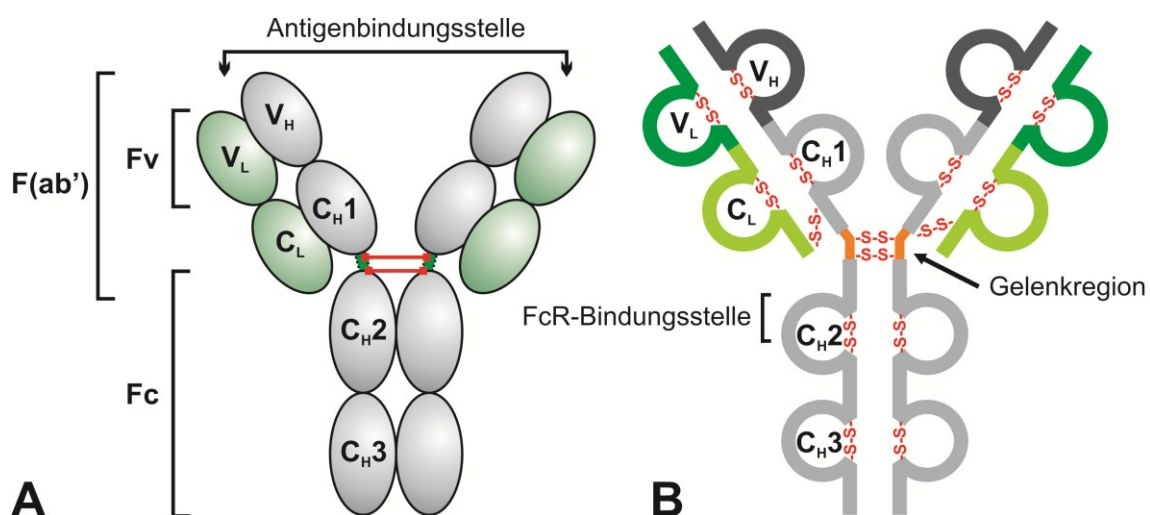
a) monomer, dimer, pentamer;

b) K: Klassischer Weg; A: Alternativer Weg; + schwach, ++ mittel, +++ stark

Wie zuvor bereits angedeutet, besteht ein Antikörper aus drei gleich großen funktionellen Einheiten, die sich durch enzymatische Proteolyse mittels Papain bzw. Pepsin voneinander trennen lassen. Das Bindeglied zwischen diesen Einheiten ist die Gelenkregion (engl. *hinge region*), eine flexible Polypeptidkette zwischen der C<sub>H</sub>1 und C<sub>H</sub>2-Domäne der schweren Ketten, deren sich gegenüberliegende Cysteinreste untereinander Disulfidbrückenbindungen ausbilden (**Abb. 1-5**). Papain hydrolysiert die Peptidbindungen N-terminal der *hinge*-Region, wodurch zwei identische antigenbindende Fragmente (Fab) entstehen. Durch die enzymatische Hydrolyse mittels Pepsin, das C-terminal der Disulfidbrücken der *hinge*-Region angreift, entsteht ein bivalentes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment sowie das Fc-Fragment, das ebenfalls unter Papaineinwirkung abgespalten wird. Aufgrund seiner leichten Kristallisation unter Pepsineinwirkung, erhielt das Fc-Fragment (engl. *fragment crystallizable*) seinen Namen (62).

Das mittels Papain-Hydrolyse entstandene Fab-Fragment besteht aus den N-terminalen variablen Domänen (V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>) sowie der konstanten (C<sub>L</sub>)- und C<sub>H</sub>1-Domäne der leichten und schweren Kette. Die variablen Domänen weisen hohe Sequenzunterschiede zwischen den Antikörpern auf – insbesondere im Bereich der Schleifenregion, weshalb dieser Abschnitt auch als variables Fragment (Fv) bezeichnet wird (**Abb. 1-5**). Zudem befindet sich in diesem

Segment das Paratop bzw. die Antigenbindungsstelle (engl. *complementarity-determining region*, CDR) eines Immunglobulins, an dessen Bildung sowohl die schwere ( $V_H$ ) als auch die leichte Kette ( $V_L$ ) beteiligt sind. Die hohe Sequenzvariabilität, mit einer geschätzten Anzahl von  $10^{16}$  unterschiedlichen Immunglobulinen, ist Ausdruck der Vielfalt an Epitopen bzw. Antigenen mit denen die Antikörper in Kontakt treten (61). Im Unterschied dazu ist die Sequenzvariabilität innerhalb der konstanten Domänen beider Ketten relativ gering und hauptsächlich im Vergleich der Isotypen und Subklassen auszumachen. Die größten Sequenzunterschiede lassen sich im Fc-Teil nachweisen, der den Isotyp des Immunglobulins bestimmt. Spezifische Fc-Rezeptoren sind für drei der fünf Immunglobulinklassen bekannt. Diese sind die Fc gamma ( $Fc\gamma$ )- und Fc alpha ( $Fc\alpha$ ) Rezeptoren sowie der Fc epsilon ( $Fc\epsilon$ ) Rezeptor, die IgG-, IgA- bzw. IgE-Antikörper binden (64). In der jüngeren Vergangenheit wurden zudem Fc-Rezeptoren entdeckt, die das pentamere IgM binden. Einer dieser Rezeptoren, der als  $Fc\alpha/\mu R$  bezeichnet wird, bindet sowohl IgA als auch IgM (65).



**Abbildung 1-5. Vereinfachte schematische Darstellung der Struktur eines IgG-Moleküls.**

**A.** Klassische Darstellung der Y-Struktur, die aus zwei identischen schweren (H = heavy; grüne Ovale) und leichten (L = light; graue Ovale) Ketten besteht. Beide Kettentypen sind über Disulfidbrückenbindungen (rote Linien) miteinander verbunden und bestehen aus einem Aminoterminalen variablen und einen Carboxyterminalen konstanten Abschnitt. Die beiden variablen Abschnitte der schweren ( $V_H$ ) und leichten Kette ( $V_L$ ) bilden das variable Fragment (Fv) an dessen N-Terminus sich die Antigenbindungsstelle befindet. Zusammen mit der konstanten Domäne der leichten Kette ( $C_L$ ) und der ersten konstanten Domäne der schweren Kette ( $C_H1$ ) bildet der Fv-Teil das sogenannte antigenbindende Fragment (Fab). C-terminal des Fab-Fragments befindet sich der Fc-Teil des Antikörpers, der aus der zweiten und dritten Domäne der schweren Kette ( $C_H2$ ,  $C_H3$ ) gebildet wird.

**B.** Darstellung der Domänenstruktur eines IgG-Moleküls, die durch zusätzliche Disulfidbrückenbindungen (-S-S-) zwischen sich gegenüberliegenden Cysteinresten innerhalb der Ketten entsteht. Die Verbindung zwischen den identischen Kettenpaaren kommt über eine oder mehrere Disulfidbrücken in der sogenannten Gelenk- oder *hinge*-Region (orange) zustande. Dicht benachbart zur *hinge*-Region, innerhalb der  $C_H2$ -Domäne, befindet sich die Region mit der der Antikörper an zelluläre Fc-Rezeptoren (FcR-Bindungsstelle) bindet. Zur weiteren Erläuterung wird auf den Haupttext verwiesen. *Eigene Darstellung in Anlehnung an (61, 66).*

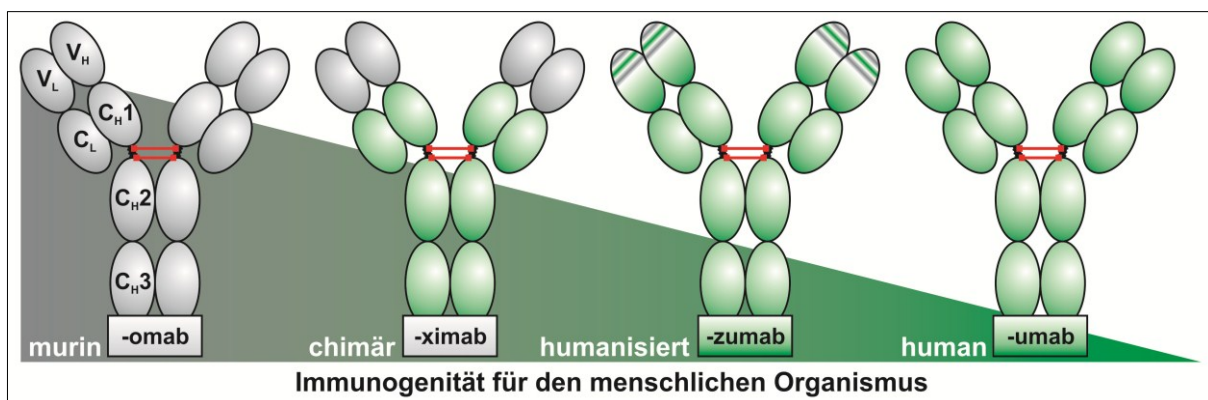


Ein weiteres strukturelles Merkmal der Immunglobuline ist ihre Glykosylierung, die je nach Isotyp und Subklasse stark variieren kann. Ein IgG1-Molekül besitzt üblicherweise zwei spiegelbildliche Glykosylierungen im Fc-Teil, wohingegen beispielsweise IgE fünf spiegelbildliche Glykosylierungen sowohl im Fc- als auch im Fab-Teil aufweist (67). Aus Gründen der Einfachheit als auch der nachfolgenden Relevanz, wird im Weiteren auf die Glykosylierung von IgG1 eingegangen. Dieses besitzt zwei benachbarte Glykosylierungsstellen im Fc-Fragment, nämlich am Asparagin 297 (Asn<sup>297</sup>) der C<sub>H</sub>2-Domäne, wo sich eine verzweigte Zuckerkette findet, deren Kernstück ein Heptasaccharid aus N-Acetylglucosamin und Mannose ist. Variiert wird dieses Grundgerüst durch Sialylsäure, Galactose sowie N-Acetylglucosamin an deren Ende, und Fucose am primären N-Acetylglucosamin des Grundgerüsts (68).

### 1.4.2 Entwicklung und Herstellung monoklonaler Antikörper

Die Etablierung der Hybridom-Technik in den 1970er und frühen 1980er Jahren durch César Milstein und Georges Köhler eröffnete neue Möglichkeiten für die Produktion monoklonaler Antikörper, die spezifisch für ein bestimmtes Antigen sind. Hierzu wurde Mäusen bzw. Ratten wiederholt ein bestimmtes Antigen appliziert, das in diesen eine humorale Immunantwort induzierte. Die hierfür verantwortlichen B-Lymphozyten, die Antikörper gegen das applizierte Antigen produzierten, haben jedoch nur eine kurze Lebensdauer. Daher wurden diese aus der Milz der immunisierten Tiere isoliert und mit einer Myelomzelllinie fusioniert, die die Fähigkeit zur selbständigen Antikörperproduktion verloren hatte. Das Resultat ist das sogenannte Hybridom, das sich durch Unsterblichkeit, Fähigkeit zur Teilung und Produktion eines bestimmten Antikörpers auszeichnete. Um Hybridome zu selektionieren, welche den gewünschten monoklonalen Antikörper produzierten, wurden die Hybridomzellen vereinzelt und in Zellkulturen vermehrt. Durch die Untersuchung des Kulturmediums mittels z.B. ELISA ließ sich herausfinden, welches Hybridom den Antikörper mit der gewünschten Spezifität produzierte (58). Die Problematik dieses Verfahrens bestand darin, dass alle auf diese Weise hergestellten monoklonalen Antikörper aufgrund ihres tierischen Ursprungs immunogen waren und vom menschlichen Immunsystem als fremd erkannt und eliminiert wurden. Ferner war ihre Wirkung aufgrund der schwachen Interaktion mit menschlichen Fc $\gamma$  Rezeptoren bzw. dem Komplementsystem begrenzt (59). Überwinden ließ sich dieses Problem durch die Herstellung chimärer Antikörper, indem die konstanten Domänen der schweren und leichten Kette von Maus-Antikörpern durch solche humanen Ursprungs ersetzt wurden. Hierzu wurden die Gene der variablen Region von Maus-Hybridomzellen kloniert, die für ein bestimmtes Antigen kodierten. Diese wurden zusammen mit Klonen der humanen Immunglobulingene, die die konstanten Domänen der schweren und leichten Kette kodierten, in einem Vektor verbunden. Der Vektor wurde in immortalisierte Myelomzellen oder andere kultivierbare Zell-

linien, wie beispielsweise Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen, eingebracht, die den chimären Antikörper schließlich sezernierten (69, 70). Da der Anteil tierischer Peptidsequenzen in chimären Antikörpern immer noch rund 30 % beträgt, sind auch diese hinsichtlich ihrer Immunogenität nicht vollkommen inert für das menschliche Immunsystem (71). Um daher die Funktionalität und Wirkung monoklonaler Antikörper weiter zu verbessern wurden diese weiter humanisiert. Hierzu hat sich die Methode des „CDR Grafting“ etabliert (72). Hierbei wird in Analogie zur Herstellung chimärer Antikörper nur noch die genetische Information der Antigen-Bindungsstelle des Antikörpers übertragen, sodass ein Großteil der variablen Region des daraufhin exprimierten Antikörpers ebenfalls human ist. Durch das Studium der Kristallstruktur von Antikörpern lassen sich die Genabschnitte, die für die Antigenbindung essentiell sind noch weiter eingrenzen, sodass im Ergebnis humanisierte Antikörper entstehen, deren Anteil tierischer Peptidsequenzen nur noch 5–10 % beträgt (71). Die geringste Immunogenität weisen jedoch humane Antikörper auf, die in transgenen Tieren (73) bzw. mittels „*phage display*“-Technologie aus humanen Immunglobulinen rekombinant hergestellt werden (74). Hierzu wurden beispielsweise gentechnisch veränderte Mausstämmen generiert, deren B-Lymphozyten die humanen Immunglobulingene besitzen. Werden diese Mäuse mit einem menschlichen Antigen immunisiert, produzieren deren B-Zellen humane Immunglobuline vom IgG-Isotyp. Analog der von Köhler und Milstein entwickelten Hybridom-Technik lassen sich auf diese Weise schließlich tierische Hybridomzelllinien etablieren, die humane Antigen-spezifische Immunglobuline produzieren (75, 76). Einen schematischen Überblick zur Nomenklatur und Klassifikation monoklonaler Antikörper liefert **Abbildung 1-6**.



**Abbildung 1-6. Klassifikation therapeutischer monoklonaler Antikörper.** Dargestellt ist der unterschiedliche Gehalt an Nagetierpeptidsequenzen (grau) im Vergleich zu humanen (grün) in den einzelnen Antikörpermolekülen und deren Benennung entsprechend internationaler Übereinkünfte. Das Dreieck repräsentiert die abnehmende Immunogenität für den menschlichen Organismus mit abnehmendem Gehalt an tierischen Peptidsequenzen. *Eigene Darstellung in Anlehnung an (66).*

### 1.4.3 Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper

Die Wirkungsweise monoklonaler Antikörper sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ist vielfältig und lässt sich allgemein in direkte, Fab-vermittelte und indirekte, Fc-vermittelte Wirkmechanismen einteilen. Die Fab-vermittelten Effekte werden dabei direkt durch die Interaktion des Antikörpers mit dem Antigen ausgelöst, das üblicherweise auf der Oberfläche von Zellen exprimiert wird. Diese Antigene sind in der Regel Rezeptoren bzw. Ionenkanäle, die über eng vernetzte intrazelluläre Signalkaskaden Teilung, Wachstum bzw. Differenzierung von Zellen bewirken. Ihre Überexpression bzw. Deregulation spielt eine entscheidende Rolle in der Transformation „gesunder“ Zellen zur unkontrolliert wachsenden Tumorzelle. Exemplarisch für solche Tumorantigene seien an dieser Stelle der *EGF*- und *Her2/neu*-Rezeptor auf Kolon-, Lungen- bzw. Mamma-Karzinomen sowie das CD20-Antigen auf Leukämie- und Lymphomzellen genannt. Hiergegen sind die Antikörper Cetuximab, Panitumumab, Trastuzumab bzw. Rituximab gerichtet (77).

Die beiden *EGFR*-Antikörper Cetuximab und Panitumumab binden mit höherer Affinität am Rezeptor als dessen natürliche Liganden und verhindern somit dessen Aktivierung (9). Da für den *Her2/neu*-Rezeptor bislang keine natürlichen Liganden bekannt geworden sind, inhibiert Trastuzumab wohl direkt die Dimerisierung des Rezeptors bzw. bewirkt dessen vorzeitige Internalisierung (78). Hinsichtlich des CD20-Antikörpers Rituximab wird die Induktion von Apoptose diskutiert. *In-vitro*-Daten deuten jedoch darauf hin, dass dessen Wirkung hauptsächlich durch die indirekten Wirkmechanismen wie Antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) bzw. Komplementabhängiger Zytotoxizität (CDC) vermittelt wird (79). Die indirekten Wirkmechanismen erfordern ebenfalls eine Fab-vermittelte Opsonisierung des jeweiligen Antigens, allerdings interagiert anschließend das Fc-Fragment des Antikörpers mit Rezeptoren (Fc Rezeptoren, FcR) auf der Oberfläche von Leukozyten, wodurch diese zum ADCC bzw. Antikörperabhängiger zellvermittelter Phagozytose (ADCP) angeregt werden. Des Weiteren bindet C1q, der Aktivator des klassischen Weges der Komplementkaskade, effektiv an die C<sub>H</sub>2-Domäne des Fc-Teils von IgG1-Antikörpern (63). Hierdurch werden die Tumorzellen mittels CDC lysiert (9). Die Bedeutung dieses Wirkmechanismus für die *in vivo* Aktivität monoklonaler Antikörper wird zurzeit jedoch noch kontrovers diskutiert (80, 81). Die Rolle des ADCC als Wirkungsweise monoklonaler Antikörper *in vivo* konnte dahingegen unter anderem durch Tiermodelle nachgewiesen werden. Uchida *et al.* und andere haben anhand von Mausmodellen gezeigt, dass die fehlende Expression von aktivierenden Fc $\gamma$  Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) oder des *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAM) mit einem Wirkverlust von Trastuzumab, Rituximab bzw. Cetuximab verbunden ist (82, 83). Darüber hinaus haben Clynes *et al.* beobachtet, dass die ADCC-Aktivität in Mäusen deutlich gesteigert war, die den inhibitorischen Fc $\gamma$ RIIb nicht exprimierten (84). Weitere Hinweise auf die

Bedeutung des ADCC *in vivo* lassen sich aus klinischen Untersuchungen ableiten, in denen die Wirksamkeit der monoklonalen CD20-, *EGFR*-, und *Her2/neu*-Antikörper Rituximab, Cetuximab bzw. Trastuzumab in Abhängigkeit von der Expression bestimmter  $\text{Fc}\gamma\text{R}$ -Polymorphismen untersucht worden ist. Hier zeigte sich, dass die Expression des  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ -131H/H bzw. des  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ -158V/V Genotyps bei den behandelten Patienten für alle untersuchten Antikörper mit einem besseren Therapieansprechen sowie mit einem längeren progressionsfreien Überleben verbunden war (12, 85-87).

Auf humanen Leukozyten werden drei Formen von  $\text{Fc}\gamma$  Rezeptoren exprimiert ( $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ ,  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ ,  $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ ), von denen jeweils die  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  und  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  noch weitere Subtypen ( $\text{Fc}\gamma\text{RIIa-c}$ ,  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa-b}$ ) aufweisen. Diese unterscheiden sich unter anderen in ihrer Funktion und Expression auf unterschiedlichen Zellpopulationen, aber auch durch genetische Polymorphismen innerhalb der Subtypen (**Tab. 1-2**). Von diesen polymorphen Formen oder Allotypen sind der  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ -131H sowie der  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ -158V von besonderer therapeutischer Relevanz. Beide Allotypen weisen auf genetischer Ebene eine Variation der Nukleotidsequenz auf, die sich auf Proteinebene in einem Austausch von Aminosäuren widerspiegelt und dadurch die Affinität des jeweiligen Rezeptors zum humanen IgG beeinflusst. Der  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ -Polymorphismus ist durch eine Substitution des Arginin (R) an Position 131 mit Histidin (H) gekennzeichnet, wodurch sich vor allem die Affinität des Rezeptors für humanes IgG2 (hIgG2) ändert. Während die Affinität sowohl des  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ -131R als auch der  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ -131H für hIgG1 ( $K_A = 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), hIgG3 ( $K_A = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) und hIgG4 ( $K_A = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) auf unterschiedlichem Niveau nahezu identisch sind, bindet der  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ -131H hIgG2 mit höherer Affinität ( $K_A = 4,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) als der  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ -131R ( $K_A = 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) (88). Von Bedeutung ist dies vor allem deshalb, da der  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ -131H der einzige Fc-Rezeptor ist, der im Vergleich mit den anderen IgG Isotypen IgG2 mit hoher Affinität bindet. Klinisch und *in vitro* zeigt sich dieser funktionelle Unterschied vor allem in der unterschiedlich hohen Phagozytoserate von mit hIgG2 opsonisierten Partikeln, die von Phagozyten deutlich schlechter aufgenommen werden, die einen homozygoten  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ -131R exprimieren (89). Der  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  weist im Gegensatz dazu eine Substitution des Valins (V) an Position 158 mit Phenylalanin (F) auf, wodurch die Affinität von hIgG1, hIgG3 und hIgG4 zum  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ -158F gegenüber dem  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ -158V deutlich reduziert ist. NK-Zellen, die einzig den aktivierenden  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  exprimieren, werden durch hIgG1, hIgG3 sowie hIgG4 deutlich besser aktiviert, wenn sie anstelle des  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ -158F Allotypen den  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ -158V exprimieren (89). Einen weiteren Überblick über die übrigen  $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptoren, die im menschlichen Organismus exprimiert werden, zeigt die nachfolgende **Tabelle 1-2**.

**Tabelle 1-2.** Übersicht der humanen Fc gamma Rezeptoren (FcγR), *nach* (89, 90)

	FcγRI	FcγRII			FcγRIII	
Subtyp	---	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIc	FcγRIIIa	FcγRIIIb
Signal-Motif	---	ITAM	ITIM	ITAM	---	---
exprimierende Zellen	Myeloische Zellen, Neutrophile Granulozyten (nach G-CSF und IFNγ-Stimulation)	Myeloische Zellen, Thrombozyten, (T-Zell-Subtypen), Endothelzellen	B-Zellen, Monozyten, Makrophagen	(NK-Zellen)	Makrophagen, NK-Zellen, (Subtypen von T-Zellen) und Monozyten	Neutrophile Granulozyten, (Eosinophile Granulozyten nach IFNγ-Stimulation)
Allotypen	---	131R / 131R	---	---	158V / 158F	NA1 / NA2
Affinität zu humanem IgG	Hoch ( $10^9 - 10^{10}/M$ )	Niedrig ( $< 10^7/M$ )	Niedrig ( $< 10^7/M$ )	Niedrig ( $< 10^7/M$ )	Niedrig ( $< 10^7/M$ )	Niedrig ( $< 10^7/M$ )
Affinität zu humanen IgG Subklassen	3>1>4>>2	131R: 3 > 1 >>> 2, 4 131R: 3 > 1, 2 >>> 4	3 > 1 > 4 >> 2	---	158V / 158F <sup>a</sup> : 1 = 3 >>> 2, 4	NA1 / NA2 <sup>b</sup> : 1 = 3 >>> 2, 4

**ITAM:** Immunoreceptor tyrosine-based activation motif; **ITIM:** Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; **G-CSF:** Granulocyte colony-stimulating factor; **IFNγ:** Interferon-gamma; **R:** Arginin; **H:** Histidin; **V:** Valin; **F:** Phenylalanin; **NA:** Neutrophilen Antigen. **a)** FcγRIIIa-158V bindet hIgG4 und hat eine höhere Affinität für hIgG1 und 3 als FcγRIIIa-158F. **b)** FcγRIIIb-NA1: höhere Affinität zu hIgG3 sowie effektivere Bindung und Phagozytose von Partikeln, die von hIgG1 und 3 opsoniert wurden.

#### 1.4.4 Optimierung monoklonaler Antikörper

Neben den weiter oben näher erläuterten Methoden zur Humanisierung monoklonaler Antikörper haben sich in den vergangenen Jahren weitere Verfahren etabliert, die insbesondere auf die Optimierung einzelner Wirkmechanismen abzielen. Hierzu zählen unter anderen die biotechnologische Modifikation der Zucker- und Proteinstruktur von Antikörpern – auch *glyco-* und *proteinengineering* genannt – wodurch sich die ADCC-Aktivität monoklonaler Antikörper verbessern lässt. Einige dieser biotechnologisch veränderten Antikörpermoleküle befinden sich bereits in klinischer Erprobung (91), darunter der CD20-Antikörper Obinutuzumab (GA-101), dessen klinische Entwicklung bisher am Weitesten fortgeschritten ist. Obinutuzumab ist ein humanisierter IgG1-Antikörper, dessen verzweigte Zuckerkette in der C<sub>H</sub>2-Domäne des Antikörpermoleküls unfucosyliert ist. Dadurch wird die Bindung des Antikörpers zum FcγRIIIa und die Induktion von ADCC deutlich verbessert (92). Bereits Shields *et al.* haben gezeigt, dass sich durch die Defucosylierung die Bindungsaffinität des Fc-Fragments zum FcγRIIIa um das 50-fache steigern lässt. Ferner beobachteten sie eine bis zum 100-fachen gesteigerte ADCC-Aktivität bei niedrigerer Antikörperkonzentration, verglichen mit einem herkömmlichen IgG1 (68). Weitere Modifikationen der Glykosylierung des Fc-Fragments scheinen dagegen nur einen geringen Einfluss auf die Funktionalität von IgG1 Antikörpern zu haben, wie sich für die Variation des Gehalts von Galaktose und Sialylsäure gezeigt hat (91, 93). Die

Expression der glykoengineerten Antikörper erfolgt hierzu beispielsweise in Lec13-Zellen, einer mutierten Variante der *Chinese Hamster Ovary* Zelllinie, die eine Mutation im GDP-Mannose 4,6-dehydratase Gen aufweist. Diese Mutation führt in den Zellen zur Expression eines inaktiven Enzyms, wodurch die Bildung von GDP-Fucose aus GDP-Mannose gehemmt wird (94). Ferner werden Hybridomzelllinien verwendet, in denen die Expression bestimmter Enzyme, zum Beispiel der  $\beta(1,4)$ -N-Acetylglucosaminyltransferase III oder der  $\alpha$ -1,6-Fucosyltransferase, auf genetischer Ebene variiert oder vollständig ausgeschaltet werden kann (13).

Ein weiterer Aspekt bei der Optimierung der Fc/Fc $\gamma$ R-Interaktion von Antikörpern beinhaltet die Variation der Aminosäuresequenz, in den für die Fc $\gamma$ R-Bindung kritischen Bereichen des Fc-Fragments (95). Shields *et al.* (96) ersetzten hierzu sequenziell die Aminosäuren der hydrophilen Abschnitte der C<sub>H</sub>2- und C<sub>H</sub>3-Domäne vom IgG1 durch Alanin und analysierten anschließend die resultierenden Antikörpervarianten hinsichtlich ihrer Affinität zu verschiedenen Fc $\gamma$  Rezeptoren. Eine Antikörpervariante mit einer Dreifach-Mutation (S298A/E333A/K334A) zeigte hierbei sowohl eine gesteigerte Affinität zum Fc $\gamma$ R11a als auch eine über das zweifache gesteigerte ADCC-Aktivität verglichen mit einem nativen IgG1 (96). Der Einsatz bildgebender Verfahren zur Analyse der 3D-Kristallstruktur von Antikörpermolekülen und deren korrespondierender Fc-Rezeptoren hat darüber hinaus die Identifikation weiterer Regionen ermöglicht, die für die Fc/Fc $\gamma$ R-Interaktion kritisch sind. So haben Lazar *et al.* eine IgG1 Variante identifiziert, die durch den Austausch von Aminosäuren (S239D/I332E) in der C<sub>H</sub>2-Domäne des Fc-Fragments eine deutlich stärkere Fc $\gamma$ R11a-Bindung sowie eine deutlich gesteigerte ADCC-Aktivität aufweist (97). Der monoklonale Antikörper XmAb5574, der die S239D/I332E-Mutation enthält und gegen das CD19-Antigen auf B-Zellen gerichtet ist (98), wird derzeit in einer Phase I Studie gegen die chronisch lymphatische Leukämie untersucht (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT01161511). Einen detaillierten Überblick über die biotechnologische Modifikation von Antikörpermolekülen liefern die Übersichtsarbeiten von Desjarlais *et al.* (13), Strohl (95) sowie Kaneko und Niwa (91).

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Wie eingangs ausführlich dargestellt wurde, sind Mutationen von *KRAS*, die in bis zu 40 % der sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen gefunden werden, ein ungünstiger prognostischer Marker für die Therapie mit den *EGFR*-Antikörpern Cetuximab und Panitumumab (40). Etwa 20-30 % der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome weisen ebenfalls eine derartige Mutation auf, die sich hier jedoch ausschließlich auf die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren auszuwirken scheint (47). Ein Einfluss von *KRAS*-Mutationen auf die Therapie des NSCLC mit *EGFR*-Antikörpern konnte bisher jedenfalls nicht nachgewiesen werden (54).

In dieser Arbeit wurde daher untersucht, welche Wirkmechanismen von *EGFR*-Antikörpern durch *KRAS*-Mutationen beeinflusst werden. Darüber hinaus war zu klären, inwiefern sich die Wirkung der *EGFR*-Antikörper vom IgG Isotyp durch das *Engineering* des Fc-Fragments verbessern lässt. Hierzu wurden drei Antikörpervarianten verwendet, die innerhalb der C<sub>H</sub>2-Domäne des Fc-Fragments durch den Austausch von Aminosäuren (I332E, S239D) mithilfe der zielgerichteten Mutagenese-Technik bzw. durch die Reduktion des Fucosegehalts, in der am Asparagin-297 gebundenen, verzweigten Zuckerkette biotechnologisch verändert wurden. Diese Veränderungen sind mit einer höheren Affinität des Fc-Fragments zum FcγRIIIa sowie mit einer deutlich gesteigerten ADCC-Aktivität von IgG1 Antikörpern verbunden (68, 97). Die Antikörpervarianten wurden im Vergleich mit einer humanisierten Variante des *EGFR*-Antikörpers Cetuximab hinsichtlich ihrer direkten (Fab-vermittelten) und indirekten (Fc-vermittelten) Wirkmechanismen untersucht. Hierzu wurden *EGFR*-exprimierende Tumorzelllinien des kolorektalen Karzinoms sowie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms verwendet, die eine Mutation im Codon 12 bzw. 13 des *KRAS*-Gens besitzen.

## 2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente mit kultivierten Tumorzellen humanen Ursprungs sowie mit humanen Blutproben gesunder Spender und deren Bestandteilen waren von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel begutachtet worden. Ein entsprechendes Votum der Ethikkommission liegt vor.

### 2.1 Verwendete Materialien

Die genaue Bezeichnung sowie die Herkunft der verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien sowie technischen Gerätschaften, die im Folgenden genannt werden, findet sich im **Anhang** in den **Tabellen A.1-1 bis A.1-3**.

#### 2.1.1 Stammmedien zur Kultivierung humaner Tumorzelllinien

Die in **Tabelle 2-2** aufgeführten Tumorzellen wurden *in vitro* in Zellkulturflaschen mit Nährmedien kultiviert. Die Zusammensetzung dieser Nährmedien variierte zum Teil stark, sodass die nachfolgende **Tabelle 2-1** einen Überblick über deren Zusammensetzung gibt. In **Tabelle 2-2** findet sich dann in der Spalte „Kulturbedingungen“ die Bezeichnung des jeweiligen Nährmediums.

**Tabelle 2-1.** Übersicht der Stammmedien zur Kultivierung humaner Tumorzelllinien

	<b>Stammmedium I</b>	<b>Stammmedium II</b>	<b>Stammmedium III</b>
<b>Basismedium</b>	RPMI-1640	DMEM	RPMI-1640
<b>Basismedium enthält</b>	L-Glutamin und Phenolrot	L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose und Phenolrot	L-Glutamin und Phenolrot
<b>Standardzusätze</b>	50 ml hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin		
<b>Spezialzusätze</b>	keine	keine	5,0 g/l D-Glucose, 1,5 g/l Natriumbicarbonat, 2 mmol/l Natriumpyruvat, 10 mmol/l HEPES

Die Stammmedien wurden unter sterilen Bedingungen verwendet, bei 4 °C gelagert und bei Bedarf in entsprechenden Portionen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.



### 2.1.2 Humane Tumorzelllinien

**Tabelle 2-2.** Übersicht über die verwendeten humanen Tumorzelllinien

Zelllinie	Tumorart	Kulturbedingungen	Bezugsquelle
A431	Plattenepithelkarzinom der Vulva	Stammmedium I	DSMZ, Braunschweig
A549	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	Stammmedium II	Cell Line Service, Eppelheim
H2030	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	Stammmedium III	ATCC, Manassas, VA, USA
HCT-116	Kolorektales Karzinom	Stammmedium II	ATCC, Manassas, VA, USA
SW-480	Kolorektales Karzinom	Stammmedium I	Genmab, Utrecht, Niederlande

### 2.1.3 Primär- und Sekundärantikörper

Zur Untersuchung zellulärer Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie oder zum Nachweis bzw. zur Untersuchung intrazellulärer Proteine mittels Immunpräzipitation oder Western-Blot wurden Primär- und Sekundärantikörper verwendet. Die Primärantikörper dienten der spezifischen Erkennung des zu untersuchenden Antigens und die Sekundärantikörper der Detektion und Visualisierung des gebundenen Primärantikörpers. Die verwendeten Antikörper, sofern nicht bereits an anderer Stelle beschrieben, sind in **Tabelle 2-3** zusammengefasst.

**Tabelle 2-3.** Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Bezeichnung	Konjugat	Hersteller
<i>Reagenzien zur Durchflusszytometrie</i>		
goat anti-mouse IgG + IgM	FITC	Dianova, Hamburg
polyclonal rabbit anti-human IgG F(ab') <sub>2</sub>	FITC	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Qifikit®		DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
<i>Reagenzien zum Western-Blot</i>		
rabbit anti-Ras antibody		Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
polyclonal goat anti-rabbit Ig	HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

FITC: Fluoresceinisothiocyanat; HRP: Horseradish Peroxidase

## 2.2 Monoklonale Antikörper

Neben den weiter unten beschriebenen Antikörpervarianten wurde in dieser Arbeit die *murine* Variante des Antikörpers Matuzumab (mIgG2a, m425) verwendet, die gegen den *EGFR* gerichtet sind. Ein humaner IgG1 Antikörper (HuMax®-KLH; Genmab, Utrecht, Niederlande), der gegen das hochmolekulare *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) Protein der Meeresschnecke *Megathura crenulata* gerichtet ist, diente als irrelevante Isotypkontrolle. Weiterhin diente ein IgG2a im Überstand des Maus B-Zell *Hybridoms* TIB-92 (ATCC, Manassas, VA, USA), der spezifisch für das *I-A* Antigen des *murinen* MHC-II-Komplexes ist, ebenfalls als Isotypkontrolle.

### 2.2.1 Konstruktion und Herstellung der *EGFR*-Antikörpervarianten

Von der Firma Xencor (Monrovia, CA, USA) wurden humanisierte *EGFR*-Antikörpervarianten produziert, deren Affinität zum humanen Fcγ Rezeptor III (FcγRIII, CD16) durch *Protein-* bzw. *Glyco-Engineering* des Fc-Fragments erhöht wurde. Hierzu wurden anhand der veröffentlichten Sequenzen (99) die Gene für die variable Region der leichten und schweren Kette von Cetuximab durch reverse PCR konstruiert und das PCR-Konstrukt in den Expressionsvektor eingebracht, der das humane kappa Leichtkettengen bzw. die schwere Kette für die konstante Region eines IgG1 enthielt (100). Die in **Tabelle 2-4** aufgeführten Änderungen der Aminosäuren im Fc-Teil der Antikörper wurden auf Vektorebene mithilfe der QuikChange® Mutagenese Technologie (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in die schwere Kette eingebracht. Die Expression der Antikörper erfolgte in HEK293E Zellen mithilfe des pTT5 Vektor Systems (NRC Biotechnology Research Institute, Montréal, Canada) (101). Alle weiteren Schritten der Antikörperexpression und -aufreinigung erfolgten wie in Lazar *et al.* und Richards *et al.* beschrieben (97, 102). Die Expression des unfucosylierten – glycoengineerten – IgG1 Antikörpers erfolgte in Lec13-Zellen wie beschrieben (102).

**Tabelle 2-4.** Übersicht über die untersuchten Antikörperkonstrukte

Antikörper	Modifikation im Fc-Fragment (C <sub>H</sub> 2-Domäne)
Wildtyp-IgG1	keine Modifikation
unfucosylierter IgG1	Fehlende Fucose am primären N-Acetylglucosamin der am Asparagin 297 gebundenen Zuckerkette
I332E	Substitution von Isoleucin 332 durch Glutamat
S239D/I332E	Substitution von Serin 239 durch Aspartat, und Substitution von Isoleucin 332 durch Glutamat

### 2.2.2 Bestimmung der Bindungsaffinität zu humanen Fc gamma Rezeptoren

Die durch *Fc-Engineering* optimierten Antikörpervarianten wurden von der Firma Xencor hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an humane Fc $\gamma$  Rezeptoren untersucht. Hierzu wurden die humanen Fc $\gamma$ R1Ia und Fc $\gamma$ R1IIa sowie deren Alloformen (Fc $\gamma$ R1Ia-R131, -H131 und Fc $\gamma$ R1IIa-V158, F158) in HEK293T-Zellen mit einem 6x His-Tag exprimiert und mittels Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt. Anschließend wurde die Bindung der *EGFR*-Antikörpervarianten an die Fc Rezeptoren mithilfe der BIACORE<sup>TM</sup>-Technologie analysiert und die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) berechnet (102).

## 2.3 Kultivierung humaner Tumorzelllinien

Für diese Arbeit wurden die in **Tabelle 2-2** aufgeführten humanen Tumorzelllinien verwendet, die adhärent wachsen und aus in flüssigem Stickstoff gelagerten Aliquots ( $5 \times 10^6$  Zellen in Kulturmedium mit 16 % DMSO) herangezogen wurden. Alle Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Einmalkunststoffprodukten behandelt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Zur Rekultivierung wurden die aliquotierten Zellen bei 37 °C im Wasserbad schnell aufgetaut, in warmes Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet in Medium resuspendiert und die Zellen in die Kulturflasche überführt, wo sie in einem Endvolumen von 20 ml Medium im Brutschrank gelagert wurden. Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen mithilfe des MycoAlert<sup>®</sup> Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Rockland, ME, USA) entsprechend den Anleitungen des Herstellers auf Mykoplasmeninfektion untersucht und ggf. durch Zugabe von Ciprofloxacin (Ciprobay<sup>®</sup>, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) zum Kulturmedium für 14 Tage behandelt.

Zur Subkultivierung der Zelllinien (Konfluenz ca. 95 %) wurde das Medium dekantiert und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS(1x) gewaschen. Danach wurden ein bis zwei Milliliter einer 0,05 % Trypsin- und 0,02 % EDTA-haltigen Lösung in die Kulturflasche gegeben und die Zellen darin im Brutschrank inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden durch wiederholtes Klopfen an der Kulturflasche und wiederbenetzen der Wachstumsfläche mit dem Trypsin-EDTA-Gemisch die Zellen von der Wandung gelöst, bis sich diese vollständig in Suspension befanden. Daraufhin wurde die enzymatische Proteolyse durch Zugabe von 10 ml FBS-haltigem Kulturmedium gestoppt und die Wandung mehrfach mit dem Medium gespült, um alle eventuell noch adhärenen Zellen zu lösen. Schließlich wurden die Zellen resuspendiert und in ein Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss überführt. Zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen, wurden nach gutem Mischen 50  $\mu$ l Zellsuspension aus dem Röhrchen entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Circa 10  $\mu$ l dieses Farbstoff-Zellsuspensionsgemisches wurden unter das Deckglas einer Neubauer-Zählkammer gege-

ben und vier äußere Großquadrate – jeweils bestehend aus vier-mal-vier Kleinquadraten – ausgezählt. Die „Anzahl vitaler Zellen je Milliliter“ Zellsuspension errechnete sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{vitale Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl vitaler Zellen aller Großquadrate}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$$

Wurden Zellen für Experimente benötigt, wurde die Zellsuspension im Anschluss zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellzahl pro Volumen des Kulturmediums eingestellt. Nach resuspendieren des Zellpellets in einem entsprechenden Volumen Kulturmedium wurde die benötigte Anzahl Zellen in ein separates Röhrchen überführt. Aus der verbliebenen Zellsuspension wurden eine Million Zellen in eine neue Kulturflasche ausgesät und in 20 ml Medium weiterkultiviert. War das Kulturmedium verbraucht – sichtbar am Farbumschlag von rot nach gelb des Indikatorfarbstoffs Phenolrot, der allen Medien zugesetzt war – wurde es erneuert bzw. die Zellen bei entsprechender Konfluenz ( $\geq 95\%$ ) im Verhältnis 1:5, 1:10 oder 1:20 geteilt. Das Verhältnis, in dem die Zellen neu ausgesät wurden, richtete sich nach der Verdopplungszeit der einzelnen Zelllinien.

## 2.4 Durchflusszytometrische Analyse

Im Durchflusszytometer werden die Zellen aus dem Probenröhrchen durch einen Flüssigkeitsstrom in die Messkammer transportiert, wo sie in einem laminaren Flüssigkeitsstrom eine im Durchmesser 75 – 200  $\mu\text{m}$  breite Kapillare (Flow Cell) durchströmen. In dieser Kapillare passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl, dessen Licht beim Auftreffen auf die Zelle gestreut und von Photodetektoren registriert wird. Die Photodetektoren wandeln die Lichtenergie in elektrische Signale um, aus denen der Computer eine graphische Darstellung errechnet. In Abhängigkeit vom Winkel, in dem der Detektor angebracht ist, der das gestreute Licht registriert, unterscheidet man das Vorwärtsstreulicht ( $0,5 - 10^\circ$ ; Forward Light Scatter) und das Seitwärtsstreulicht ( $90^\circ$ ; Side Scatter). Das Vorwärtsstreulicht ist hauptsächlich von der Größe und das Seitwärtsstreulicht von der Granularität einer Zelle abhängig. Mithilfe optischer Filter- und Spiegelsysteme kann zusammen mit dem Seitwärtsstreulicht die Fluoreszenz einer Zelle registriert werden, die von ihr selbst oder von auf ihrer Oberfläche aufgetragenen Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) emittiert wird (103). Hierfür wird das Licht des Laserstrahls vom jeweiligen Fluorochrom in seinem spezifischen Wellenlängenbereich absorbiert, wodurch Elektronen angeregt und aus dem Grundzustand auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Bei der Rückkehr der Elektronen in den Grundzustand geht ein Teil der Energie verloren, sodass das emittierte Licht in Form von Photonen von geringerer Energie und folglich größerer Wellenlänge ist. Das Fluoreszenzlicht wird von einem soge-

nannten Photomultiplier registriert, der das schwächere Fluoreszenzsignal zunächst verstärkt und dann ebenfalls in elektrische Signale umwandelt. In dieser Arbeit wurden Sekundärantikörper verwendet, die mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein gekoppelt sind. Fluorescein bzw. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) hat in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8,0) sein Absorptionsmaximum bei 492 nm und sein Emissionsmaximum bei 518 nm (104).

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen zusammen mit einem antigenspezifischen Antikörper (Primärantikörper) in sättigender oder steigender Konzentration in PBS(1x) mit 0,5 % bovinem Serumalbumin und 0,1 % Natriumazid (PBS-Puffer) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und zentrifugiert, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurden die Zellen für weitere 30 Minuten auf Eis mit einem FITC-gekoppelten Antikörper (Sekundärantikörper; **Tab. 2-3**) inkubiert und erneut zweimal gewaschen. Um die quantitative Antigenexpression auf der Zelloberfläche zu bestimmen wurde das Qifikit® entsprechend der Anleitung des Herstellers genutzt. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer gemessen.

## **2.5 Nachweis von konstitutiv aktiviertem RAS**

### **2.5.1 Präzipitation von RAS**

Die Immunpräzipitation beruht auf dem Prinzip der Interaktion zwischen antigenen Epitopen und Paratopen, die zu einer Quervernetzung und Ausfällung der interagierenden – zuvor löslichen – Proteine führt, was klassischerweise über die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen erfolgt. Hier wurde ein Fusionsprotein verwendet, welches aus der RAS-bindenden Domäne (RBD) von Raf-1 und einer Glutathion-S-Transferase besteht, über die es an glutathionhaltige Agarosebeads als Präzipitationsmatrix gekoppelt war.

Die zu untersuchenden Zellen wuchsen über Nacht in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm, mit fünf Millionen Zellen pro Schale. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit kaltem PBS(1x) gewaschen und durch zentrifugieren pelletiert. Danach wurden sie in Lysepuffer, der ein Gemisch aus Proteaseinhibitoren enthielt, für fünf Minuten auf Eis inkubiert und anschließend drei Mal für je 5 Sekunden im Ultraschall-Wasserbad sonifiziert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand gewonnen und die Proteinmenge mithilfe des BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) entsprechend der Anleitung des Herstellers bestimmt. Im Anschluss wurden 500 µg nativen Proteins mit 10 µl Raf-1 RBD agarose Beads für eine Stunde bei 4 °C inkubiert, um aktiviertes RAS zu präzipitieren. Die Präzipitate wurden drei Mal mit Lysepuffer gewaschen, durch kochen in 40 µl Lämmli-Puffer(2x) denaturiert und anschließend mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 2.5.2 Detektion des präzipitierten RAS mittels Western-Blot

Die zuvor mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennten Präzipitate wurden auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran überführt und der Erfolg des Transfers durch Färben des Trenngels überprüft. Alle weiteren Inkubationsschritte der Membran erfolgten unter leichtem Schütteln. Nach jeweils 5 Minuten in Methanol und TBS Puffer wurde die Membran für eine Stunde in TBS-Puffer mit fünf Prozent (w/v) Magermilchpulver inkubiert, um die unspezifischen Proteinbindestellen abzublocken. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran bei 4 °C über Nacht zusammen mit dem RAS-spezifischen Primärantikörper (**Tab. 2-3**), der in 14 ml TBS-Puffer zusammen mit einem Prozent Magermilchpulver (w/v) im Verhältnis 1:1000 (v/v) verdünnt wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran 30 Minuten bei Raumtemperatur in 25 ml TBS-Puffer mit Tween® 20, das zuvor im Verhältnis 1:1000 (v/v) zum TBS-Puffer gegeben wurde, gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (**Tab. 2-3**), der im Verhältnis 1:5000 (v/v) in 14 ml TBS-Puffer mit einem Prozent Magermilchpulver verdünnt wurde. Nach einer Stunde Inkubation der Membran bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper, erfolgte ein weiterer Waschschrift für 30 Minuten bei Raumtemperatur in TBS-Puffer mit Tween 20. Im Anschluss erfolgte die Visualisierung des Blots mittels Chemielumineszenz mit dem Pierce Super Signal Western Blotting Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) entsprechend der Anleitung des Herstellers.

## 2.6 Isolation humaner Leukozyten

### 2.6.1 Probengewinnung und -verarbeitung

Zur Aufreinigung humaner Leukozyten wurde venöses Blut gesunder Spender verwendet. Diese wurden aus der Datenbank des Forschungslabors der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie im Dr.-Mildred-Scheel-Haus sowie unter den Mitarbeitern des Forschungslabors, in dem diese Arbeit angefertigt wurde, rekrutiert. Die in der Datenbank befindlichen Spender sind Freiwillige, die der Verwendung und Untersuchung ihres Blutes zu Forschungszwecken schriftlich zugestimmt haben. Die Blutproben wurden mittels Punktion der Cubitalvenen gewonnen und von einem Großteil der Spender hinsichtlich der Polymorphismen des FcγRIIa sowie des FcγRIIIa untersucht. Hierzu wurde aus dem Vollblut genomische DNA mithilfe des QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend den Anleitungen des Herstellers isoliert. Die gewonnene DNA wurde wie bei Schneider-Merck *et al.* (105) beschrieben bezüglich des FcγRIIa-R131H und des FcγRIIIa-V158F Polymorphismus untersucht.

### 2.6.2 Aufreinigung humaner Leukozyten über Percoll-Dichtegradienten

Leukozyten lassen sich entsprechend der englischen Nomenklatur grob in zwei Fraktionen einteilen, den *Mononuclear Cells* (MNC) und den *Polymorphonuclear Cells* (PMN). Die MNC-Fraktion besteht aus den Lymphozyten (einschließlich der NK-Zellen), Monozyten und deren Untergruppen, wohingegen zur PMN-Fraktion die neutro-, baso- und eosinophilen Granulozyten zählen (62). Beide Fraktionen lassen sich mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation voneinander trennen, deren Durchführung im Rahmen dieser Arbeit weitestgehend der Beschreibung von Peipp *et al.* entspricht (93).

Dazu wurde frisch entnommenes peripheres Venenblut von freiwilligen Blutspendern, das im Verhältnis 1:10 mit Natrium-Citrat versetzt war, über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten aus 70- und 63 % Percoll-Lösung geschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation ohne Bremse wurden die MNC's an der Grenzfläche zwischen Plasma- und Percollschicht sowie die PMN's an der Grenzfläche der beiden Percollschichten vorsichtig abpipettiert. Die MNC's wurden dreimal für 10 Minuten bei niedriger Geschwindigkeit in einer Lösung aus PBS mit 0,5 % BSA (w/v) und 2 mM EDTA zentrifugiert, um die enthaltenen Thrombozyten auszuwaschen. In der PMN-Fraktion verbliebene Erythrozyten wurden durch hypotone Lyse mit kaltem destilliertem Wasser entfernt. Die Reinheit der isolierten MNC's und PMN's wurde durch Zytospinpräparation unter dem Lichtmikroskop und im Durchflusszytometer überprüft. Die Vitalität der aufgereinigten Zellen wurde durch Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch bestimmt und war >95 %.

## 2.7 Zytotoxizitätstests

Zur Untersuchung der Zytotoxizität von *EGFR*-Antikörpern auf Tumorzellen mittels isolierter Immuneffektorzellen wurden je Versuchsanordnung mindestens drei unabhängige Chrom[<sup>51</sup>Cr]-release-Assays durchgeführt. Das Chrom-51 wird während der Inkubation von einer bis zwei Stunden von den Tumorzellen aufgenommen und akkumuliert in deren Zytoplasma durch kovalente Bindung an zytoplasmatische Proteine. Durch einen Waschschrift wird nicht aufgenommenes Chrom entfernt und die radioaktiv markierten Tumorzellen zusammen mit den zu untersuchenden Antikörpern sowie den isolierten Immuneffektorzellen für drei Stunden kultiviert. Nach Ablauf dieser Inkubationsperiode wurden die Zellen kurz zentrifugiert, der Überstand gewonnen und anschließend im Gammacounter gemessen. Der Gammacounter misst die Aktivität des Radioisotops [<sup>51</sup>Cr], das durch tote Tumorzellen in den Überstand freigesetzt wurde. Das Verhältnis der Aktivität von [<sup>51</sup>Cr] im Versuchsansatz zur Aktivität des mittels saurer Zelllyse maximal freigesetzten [<sup>51</sup>Cr], entspricht der Antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität. Die Methode zur Untersuchung des ADCC entspricht wei-

testgehend der Beschreibung von Peipp *et al.* (93, 106). Wesentliche Modifikationen sind nachfolgend beschrieben.

Die Tumorzellen (Targetzellen) wurden mit 100 µCi (7,4 MBq) Chrom-51 [<sup>51</sup>Cr] pro eine Million Zellen für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der radioaktiv markierten Tumorzellen, wurden diese auf 10<sup>5</sup> Zellen/ml eingestellt. *EGFR*-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen und Kulturmedium wurden in 96-Loch Rundboden Mikrotiterplatten pipettiert. Der Versuch wurde durch Zugabe der isolierten MNC's oder PMN's (Effektorzellen) und der Targetzellen gestartet, resultierend in einem Endvolumen von 200 µl je Vertiefung. Das Effektor-zu-Targetzell-Verhältnis (E:T-Ratio) betrug, sofern nicht anders angegeben, 80:1. Nach drei Stunden Inkubation bei 37 °C wurde der Versuch durch zentrifugieren der Platten gestoppt und 95 µl Überstand je Vertiefung mit der Mehrkanalpipette in Messröhrchen überführt. Die Freisetzung des [<sup>51</sup>Cr] wurde mithilfe des Gammacounters aus dem Überstand von Triplikaten in „counts per minute“ (cpm) gemessen und die Zytotoxizität in „Prozent spezifischer Lyse“ nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{(\text{experimentelle cpm} - \text{basal cpm})}{(\text{maximal cpm} - \text{basal cpm})} \times 100$$

Das freigesetzte [<sup>51</sup>Cr] im Überstand des Versuchsansatzes repräsentierte die experimentelle Freisetzung (exp. cpm), von Targetzellen mit Kulturmedium entsprach der basalen Freisetzung (basal cpm) und die maximale Freisetzung (max. cpm) der Aktivität von [<sup>51</sup>Cr] im Überstand von Targetzellen nach Zusatz von Perchlorsäure in einer Endkonzentration von 3 %. Die Antikörperunabhängige Zytotoxizität der mono- bzw. polymorphnukleären Zellen wurde durch Inkubation von Target- und Effektorzellen ohne Antikörper bestimmt.

## 2.8 Untersuchung des Tumorzellwachstums (MTS-Assay)

Der MTS-Assay ist eine nicht-radioaktive, kalorimetrische Methode zum semiquantitativen Nachweis vitaler Zellen. Das gelbe [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] wird dabei von stoffwechselaktiven Zellen und in Anwesenheit von Phenazinmethosulfat (PMS) zum wasserlöslichen, violetten Formazan reduziert. Formazan absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 490 nm und kann photometrisch gemessen werden, wobei die Höhe der Absorption direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen ist (107). Dabei entspricht die Bildung des Formazan, der Entstehung von NADH<sup>+</sup> in den Mitochondrien lebender Zellen unter anaeroben Bedingungen. Die Methode des MTS-Assay entspricht der Beschreibung von Mosmann *et al.* (108) unter Verwendung des CellTiter 96® Cell Proliferation Assay (Promega Corp., Madison, WI, USA) entsprechend den Anleitungen des Herstellers.



Zur Untersuchung des Einfluss von *EGFR*-Antikörpern auf das Wachstum von Tumorzellen wurden 5.000 Zellen in 100 µl Kulturmedium pro Vertiefung einer 96-Loch Flachboden Gewebekulturplatte gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit den *EGFR*-Antikörpern in 25 µl Kulturmedium, einer fünffach konzentrierten seriellen Verdünnung behandelt, resultierend in unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Antikörpers pro Vertiefung. Nach 72 Stunden Kultivierung bei 37 °C im Brutschrank wurden 25 µl der Substratlösung (23,75 µl MTS + 1,25 µl PMS) in jede Vertiefung pipettiert und die Zellen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Absorption des gebildeten Formazans wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm im ELISA Lesegerät gemessen und das Verhältnis vitaler Zellen nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ vitale Zellmasse} = \frac{\text{Test}}{\text{Kontrolle}} \times 100$$

„Test“ repräsentiert die Absorption der Vertiefungen mit *EGFR*-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen und Tumorzellen, während „Kontrolle“ der Absorption von unbehandelten Tumorzellen entspricht.

## 2.9 Statistische Auswertung

### 2.9.1 Darstellung der Ergebnisse

Zur graphischen Darstellung und statistischen Analyse der Ergebnisse wurde die Software Prism® 4.0 der Firma GraphPad Software, Inc. (CA, USA) verwendet. Die graphische Darstellung erfolgte in Balken- bzw. Liniendiagrammen, wobei die Höhe der Balken bzw. jeder Punkt im Liniendiagramm den Mittelwert und die Fehlerindikatoren den Standardfehler des Mittelwerts (engl. *standard error of the mean*; SEM) repräsentieren. Die Darstellung von Messwerten in Tabellen bzw. im Text erfolgte, sofern nichts anderes angegeben ist, ebenfalls als Mittelwert ± SEM. Wenn die Berechnung des Standardfehlers vom Mittelwert nicht möglich oder sinnvoll war, wurde das 95%-Konfidenzintervall (95% KI) angegeben.

### 2.9.2 Statistische Analyse

Um die Liniendiagramme übersichtlicher zu gestalten, wurde mithilfe der Statistiksoftware anhand eines nicht-linearen Regressionsmodells eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve konstruiert. Die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) und die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) wurde anhand der sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve ermittelt.

Um statistische Unterschiede zwischen den Ergebnissen zu analysieren, wurde der gepaarte, zweiseitige t-Test – bzw. im Falle der  $EC_{50}$  und  $IC_{50}$  der F-Test – verwendet. Beide statis-

tischen Tests dienen dem Vergleich zweier Stichproben hinsichtlich ihrer Gleichheit. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) lautete: „Die untersuchten Antikörper unterscheiden sich je Dosisstufe nicht hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Lyse bzw. Wachstumsinhibition von Tumorzellen.“ Wo hingegen die Alternativhypothese ( $H_1$ ) lautete: „Die untersuchten Antikörper unterscheiden sich je Dosisstufe hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Lyse bzw. Wachstumsinhibition von Tumorzellen.“ Das zuvor festgelegte Signifikanzniveau betrug fünf Prozent. Es wurde sodann der  $p$ -Wert berechnet und die Nullhypothese verworfen, wenn der berechnete  $p$ -Wert kleiner bzw. gleich 0,05 ( $p \leq 0,05$ ) war.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswahl und Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

Zur Untersuchung der Wirkmechanismen von *EGFR*-Antikörpern auf Tumorzelllinien mit aktivierenden *KRAS*-Mutationen, wurden aus der wissenschaftlichen Literatur die Kolonkarzinomzelllinien HCT-116 und SW-480 sowie die Zelllinien eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms A549 und H2030 ausgewählt (109-111). Als Referenz diente die etablierte Plattenepithelkarzinom-Zelllinie A431, die einen *KRAS* Wildtyp aufweist (112).

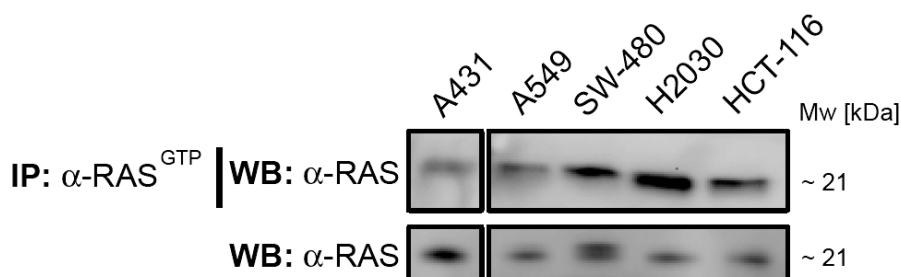
**Tabelle 3-1.** *EGFR*-Expression und *KRAS*-Phänotyp der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	<i>EGFR</i> -Expression / Zelle*	<i>KRAS</i> -Phänotyp <sup>f</sup>
<b>A431</b>	2.056.108 ± 399.361	Wildtyp
<b>HCT-116<sup>‡</sup></b>	45.062 ± 5.638	Heterozygot G13D
<b>SW-480</b>	48.059 ± 6.478	Homozygot G12V
<b>A549</b>	255.890 ± 21.063	Homozygot G12S
<b>H2030<sup>†</sup></b>	166.400 ± 31.407	Homozygot G12C

\* durch indirekte Immunfluoreszenz mithilfe des Qifikit<sup>®</sup> bestimmt ( $n \geq 3$ ); <sup>‡</sup> besitzt zusätzlich eine heterozygote Mutation von PI3KCA; <sup>†</sup> besitzt zusätzlich eine homozygote p53 Mutation; C: Cystein; D: Aspartat; G: Glycin; S: Serin; V = Valin. <sup>f</sup> Quelle: Onlinedatenbank des Cancer Genome Project des Sanger Institute ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)).

Der *KRAS*-Phänotyp der untersuchten Tumorzelllinien wurde mithilfe der Onlinedatenbank des *Cancer Genome Project* ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)) recherchiert, das am Sanger Institute (Hinxton, Cambridge, Vereinigtes Königreich) beheimatet ist. Hier findet sich hinsichtlich des *KRAS* Status für die CRC-Zelllinie SW-480 sowie die beiden NSCLC-Zelllinien A549 und H2030 eine Substitution des Glycin an Position 12 und für die CRC Zelllinie HCT-116 eine Substitution von Glycin an Position 13 des *KRAS* Proteins. Bis auf die HCT-116 weisen alle verwendeten CRC- und NSCLC-Zelllinien eine homozygote Mutation von *KRAS* auf. Die Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 besitzt dagegen ein nicht-mutiertes *KRAS* Protein. Zum *EGFR* Status finden sich weder in der Literatur noch der Datenbank des Sanger Institute's Informationen über Mutationen. Lediglich für die Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 ist eine Überexpression des *EGF*-Rezeptors in der Literatur beschrieben (113). Zur Bestimmung der quantitativen Expression des *EGF*-Rezeptors auf der Zelloberfläche, wurden die Tumorzelllinien mittels Durchflusszytometrie unter Zuhilfenahme des Qifikit<sup>®</sup> im eigenen Labor untersucht. Es fanden sich Expressionen von  $45.062 \pm 5.638$  bis  $48.059 \pm 6.478$  Rezeptormolekülen pro Zelle für die CRC-Zelllinien sowie von  $166.400 \pm 31.407$  bis  $255.890 \pm 21.063$  Rezep-

tormolekülen pro Zelle für die NSCLC-Zellen und von  $2.056.108 \pm 399.361$  Rezeptormoleküle pro Zelle für die Zelllinie A431 (**Tab. 3-1**).



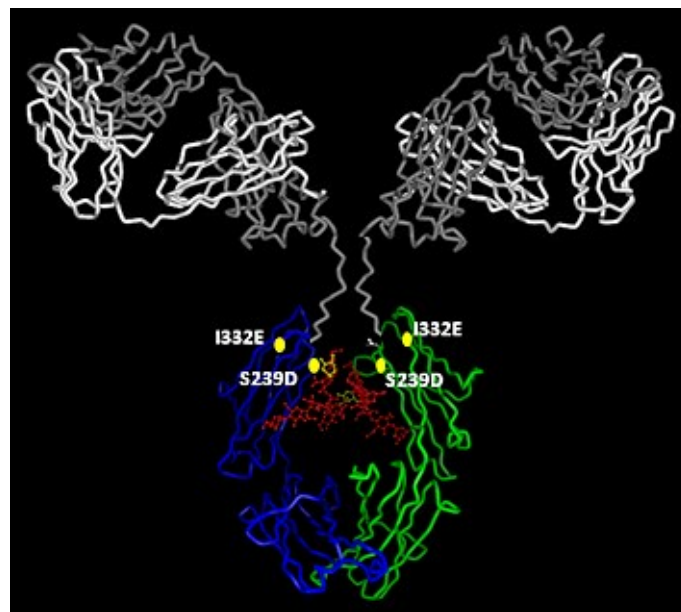
**Abbildung 3-1. Nachweis von aktiviertem und gesamtem RAS Protein mittels Immunpräzipitation und Western-Blot.** Die Zelllinien A431, A549, SW-480, H2030 und HCT-116 wurden über Nacht in Zellkulturschalen mit 5 Millionen Zellen pro Schale kultiviert. Am nächsten Tag wurde GTP-gebundenes aktiviertes RAS mittels Immunpräzipitation an Raf-1 RBD agarose beads aus 500 µg nativem Protein extrahiert. Präzipitiertes RASGTP und 15 µg natives Proteinextrakt wurden durch SDS-PAGE Gelelektrophorese separiert und anschließend mittels Western-Blot und RAS Antikörper detektiert. Dargestellt ist ein Ausschnitt des mittels Chemielumineszenz sichtbar gemachten Blots, der das detektierte RAS-Protein (Molekulargewicht: ca. 21 kDa) abbildet. IP: Immunpräzipitation; WB: Western-Blot; α-Ras: anti-Ras; Mw: Molecular weight; kDa: Kilo-Dalton. *Mit freundlicher Unterstützung von Dr. Stefanie Derer (Sektion für Stammzell- und Immuntherapie, UK S-H Campus Kiel).*

Zum Nachweis der konstitutiven Aktivierung von *KRAS*, die mit einer Mutation des Proteins verbunden ist, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierzu wurde GTP-gebundenes aktiviertes *KRAS* mittels Raf-1-RBD-beads präzipitiert und parallel mit 15 µg nativem Proteinextrakt in der SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden im Western-Blot mit einem *RAS* Antikörper detektiert. Hierbei zeigten sich intensivere Banden für *RAS*<sup>GTP</sup> in den Kolon- und Lungenkarzinomzelllinien verglichen mit der den *KRAS*-Wildtyp exprimierenden Zelllinien A431. Bei der Untersuchung des gesamten *RAS*-Proteins zeigten sich hingegen kaum Unterschiede hinsichtlich der Intensität der Banden innerhalb der Zelllinien (**Abb. 3-1**).

### 3.2 Charakterisierung der *EGFR*-Antikörpervarianten

Um die Wirkung *EGFR*-gerichteter Antikörpertherapeutika gegen Tumorzellen mit aktivierenden Mutationen des *KRAS* Proteins zu untersuchen, wurden von der Firma Xencor (Monrovia, Californien, USA) humanisierte Antikörpervarianten von Cetuximab (chimärer IgG1, Erbitux<sup>®</sup>) hergestellt. Diese umfassen eine native, humanisierte IgG1-Variante von Cetuximab (= Wildtyp-IgG1) sowie zwei weitere Antikörper, deren Fc-Teil durch *Protein-Engineering* modifiziert wurde. Dazu wurden mithilfe der „Site-directed Mutagenesis“-Technologie Mutationen in den DNA-Abschnitt eingebracht, der für die schwere Kette des IgG1 Moleküls codiert. Die resultierenden Antikörper besitzen korrespondierende Substitutionen von Aminosäuren in

der C<sub>H</sub>2-Domäne des IgG1-Moleküls, die sich auf die Bindungsaffinität zu humanen Fc $\gamma$  Rezeptoren auswirken. Substituiert wurden hierbei die Aminosäure Isoleucin an Position 332 durch Glutamat (= I332E) und zusätzlich die Aminosäure Serin an Position 239 durch Aspartat (= S239D/I332E). Die eingeführten Aminosäuresubstitutionen waren hierbei namensgebend für die Antikörpervarianten, entsprechend der Nomenklatur nach Kabat *et al.* (114). Eine weitere Antikörpervariante mit Wildtyp-Sequenz, wurde in der Zelllinie Lec-13 exprimiert. Hierdurch entstand ein IgG1 Antikörper, dessen kovalent am Asparagin 297 gebundene komplexe Zuckerkette hinsichtlich Fucose defizient ist (= IgG1 fuc(-)) (**Abb. 3-2**).



**Abbildung 3-2. Schematische Darstellung der Kristallstruktur eines IgG1 Moleküls.** Dargestellt ist die Kristallstruktur eines IgG1 als *Ribbon*-Diagramm. Graue und weiße Linien kennzeichnen die Fab-Region des Antikörpers, wobei die leichte Kette in Weiß und die schwere Kette in Grau dargestellt ist. Die blauen und grünen Abschnitte bilden den Fc-Teil, in deren Mitte sich die korrespondierenden rot markierten komplexen Zuckerketten abbilden. Die gelben Längsovale im oberen Fc-Teil kennzeichnen die Region der Aminosäuresubstitutionen durch das *Fc-Engineering*; und die in der Antikörper-Glycovariante defiziente Fucose ist durch eine gelbe Ringstruktur in der komplexen Zuckerkette dargestellt. D: Aspartat, E: Glutamat, I: Isoleucin, S: Serin. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Matthias Peipp (Sektion für Stammzell- und Immuntherapie, UK S-H Campus Kiel).

### 3.2.1 Bestimmung der Affinität zu humanen Fc $\gamma$ Rezeptoren

Die Erhöhung der Affinität zu humanen Fc $\gamma$  Rezeptoren und damit die Verbesserung Fc-vermittelter Wirkmechanismen ist das Ziel der zuvor beschriebenen Modifikationen im Fc-Teil der untersuchten Antikörper. Um die erreichte Affinitätserhöhung zu bestimmen, wurden von der Firma Xencor Bindungstests mittels BIACORE™ durchgeführt. Das BIACORE™-Gerät misst die Assoziations- und Dissoziationskinetik zwischen Antikörper und Fc Rezeptor, anhand derer schließlich die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) für den jeweiligen Antikörper berechnet wird.  $K_D$  gibt dabei die Konzentration des Antikörpers an, bei der die Konzentration von

freiem  $Fc\gamma$  Rezeptor gleich der des Antikörper-Fc-Rezeptor-Komplexes ist. Sie ist ein quantitatives Maß für die Affinität zwischen Antikörper und Fc Rezeptor, und verhält sich umgekehrt proportional zur Affinität des Antikörpermoleküls. Das heißt, je kleiner  $K_D$  umso größer ist die Affinität des Antikörpers zum  $Fc\gamma R$ .

**Tabelle 3-2.** Affinität der *EGFR*-Antikörpervarianten zu humanen  $Fc\gamma$  Rezeptoren

Antikörper	$K_D$ [nM] (Vielfaches gegenüber <i>Wildtyp-IgG1</i> )			
	$Fc\gamma RIIa-131H$	$Fc\gamma RIIa-131R$	$Fc\gamma RIIIa-158V$	$Fc\gamma RIIIa-158F$
Wildtyp-IgG1	640 (1,0)	870 (1,0)	250 (1,0)	920 (1,0)
I332E	680 (0,94)	610 (1,4)	14 (18)	84 (11)
S239D/I332E	400 (1,6)	530 (1,6)	34 (7,4)	200 (4,6)
unfucosylierter IgG1	210 (3,0)	160 (5,4)	5 (50)	24 (38)

Es wurde jeweils die Affinität der einzelnen Antikörpervarianten zum  $Fc\gamma RIIa$  sowie  $Fc\gamma RIIIa$  und deren Allotypen ( $Fc\gamma RIIa-131H/R$  und  $Fc\gamma RIIIa-158V/F$ ) bestimmt. Die Affinität des Wildtyp-IgG1 mit einer  $K_D$  von 640 nM und 870 nM für den  $Fc\gamma RIIa-131H$  bzw. -131R sowie 250 nM und 920 nM für den  $Fc\gamma R-158V$  bzw. -158F diente als Referenz für die Antikörpervarianten. Die durch *Protein-Engineering* erzielte Affinitätserhöhung zum  $Fc\gamma RIIa$  betrug für die I332E-Variante das 1,6-fache und für die S239D/I332E-Variante das 3- bis 5,4-fache gegenüber dem Wildtyp-IgG1. *Glyco-Engineering* hatte hingegen keinen Einfluss auf die Affinität zum  $Fc\gamma RIIa$ . Ein großer Effekt des *Fc-Engineering* zeigte sich für die Affinität zum  $Fc\gamma RIIIa$ , hier konnte abhängig vom Allotyp des Rezeptors eine Affinitätserhöhung zwischen dem 4,6-fachen für die Affinität der I332E-Variante zum  $Fc\gamma RIIIa-158F$  und dem 50-fachen für die Affinität der S239D/I332E-Variante zum  $Fc\gamma RIIIa-158V$  gegenüber dem Wildtyp-IgG1 erzielt werden. Eine detaillierte Übersicht der Ergebnisse zeigt **Tabelle 3-2**.

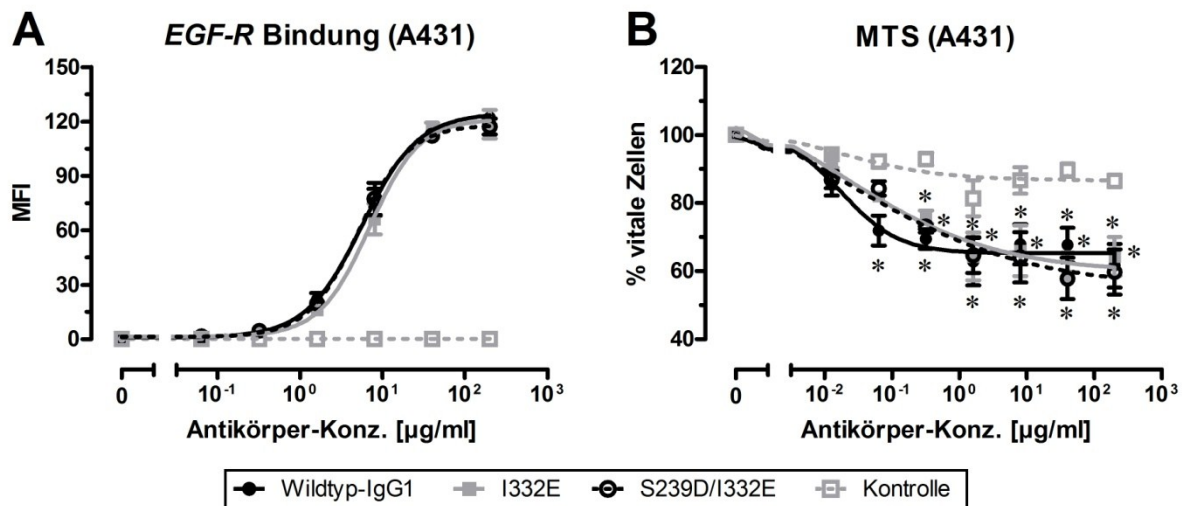
### 3.2.2 Charakterisierung Fab-vermittelter Wirkmechanismen

Nachdem die Bindungseigenschaften der Antikörper zu humanen  $Fc\gamma$  Rezeptoren und deren Allotypen untersucht wurden, sollten im nächsten Schritt die Wirkmechanismen näher betrachtet werden. Wie einleitend bereits beschrieben, kann man diese in direkte und indirekte Mechanismen unterteilen. Die direkten Wirkmechanismen werden durch die Fab-Fragmente des Antikörpers vermittelt und sollen zunächst Gegenstand der Betrachtung sein. Dazu wurde die Affinität der Antikörper zum *EGF*-Rezeptor untersucht, der auf der Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 überexprimiert wird. A431 Zellen wurden hierzu zusammen mit den Antikörpern in absteigender Konzentration inkubiert, anschließend mit FITC-gekoppelten  $F(ab')_2$ -Fragmenten eines *rabbit* anti-human IgG's gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Anhand der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen, ließ sich in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve konstruieren, anhand derer die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) bestimmt wurde. Diese repräsentiert die Konzentration, bei der die Hälfte der *EGF*-Rezeptoren an der Zelloberfläche von den Antikörpern opsoniert sind. Es ergaben sich  $EC_{50}$ -Werte von 5,7  $\mu\text{g/ml}$  (95 % Konfidenzintervall [95 % KI]: 4,6 – 6,9  $\mu\text{g/ml}$ ) für den Wildtyp-IgG1, 6,9  $\mu\text{g/ml}$  (95 % KI: 5,4 – 9,0  $\mu\text{g/ml}$ ) für die I332E- und 5,2  $\mu\text{g/ml}$  (95 % KI: 4,1 – 6,5  $\mu\text{g/ml}$ ) für die S239D/I332E-Antikörpervariante (**Abb. 3-3 A**). Damit zeigten sich alle drei untersuchten Antikörper nahezu identisch hinsichtlich ihrer Affinität zum *EGF*-Rezeptor.

Im nächsten Schritt wurde das Wachstum von A431 Zellen in Anwesenheit der Antikörper untersucht. Dazu wurden jeweils der Wildtyp-IgG1, die I332E- und S239D/I332E-Variante sowie ein unspezifischer Kontrollantikörper in steigender Konzentration zusammen mit A431 Zellen in vollständigem Kulturmedium kultiviert. Nach einer Inkubation von 72 Stunden im Brutschrank wurde die Anzahl vitaler Zellen mithilfe des MTS-Assay bestimmt. Zusätzlich wurde nach graphischer Auswertung, anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) ermittelt. Diese gibt an, bei welcher Konzentration des Antikörpers eine halbmaximale Inhibition des Zellwachstums eintritt. Für die höchste Konzentration (200  $\mu\text{g/ml}$ ) zeigte sich nach 72-stündiger Behandlung mit den Antikörpern eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Inhibition des Wachstums der A431 Zellen gegenüber den mit Kontrollantikörper behandelten Zellen. Der Anteil vitaler Zellen betrug 61,6 %  $\pm$  6,4 % für den Wildtyp-IgG1, 64,3 %  $\pm$  5,7 % für die I332E- und 59,8 %  $\pm$  6,6 % für die S239D/I332E-Antikörpervariante gegenüber 86,5 %  $\pm$  1,9 % für den Kontrollantikörper. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen *EGFR*-Antikörpern fanden sich nicht. Ferner wurden  $IC_{50}$ -Werte von 0,014  $\mu\text{g/ml}$  (95 % KI: 0,0023 – 0,0867  $\mu\text{g/ml}$ ) für den Wildtyp-IgG1, von 0,077  $\mu\text{g/ml}$  (95 % KI: 0,011 – 0,543  $\mu\text{g/ml}$ ) für die I332E- und 0,058  $\mu\text{g/ml}$  (95 % KI: 0,002 – 1,733  $\mu\text{g/ml}$ ) für die S239D/I332E-Antikörpervariante ermittelt. Hinsichtlich der  $IC_{50}$ -Werte fanden sich weder gegenüber dem Kontrollantikörper noch zwischen den einzelnen *EGFR*-Antikörpern statistisch signifikante Unterschiede (**Abb. 3-3 B**).

Zusammenfassend zeigen, nach 72-stündiger Behandlung der A431 Zellen mit den Antikörpern, die maximale Inhibition des Zellwachstums sowie die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte eine annähernd identische Fab-vermittelte Wirkung des Wildtyp-IgG1 sowie der I332E- und S239D/I332E-Antikörpervarianten.



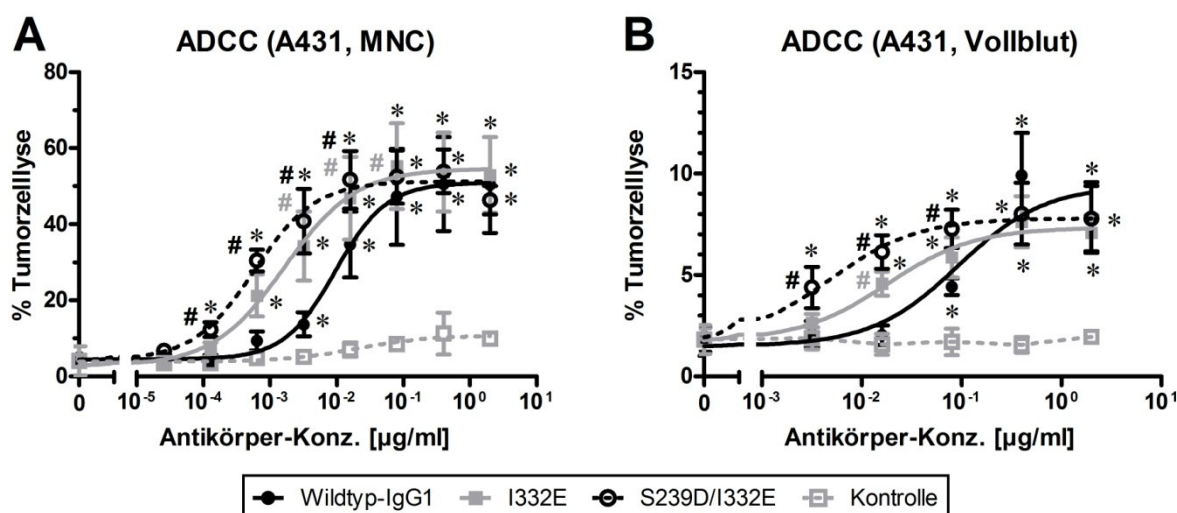
**Abbildung 3-3. Charakterisierung Fab-vermittelter Wirkmechanismen mittels indirekter Immunfluoreszenz und MTS-Assay.** Der Wildtyp-IgG1, die I332E- und S239D/I332E-Antikörpervarianten sowie KLH (Kontrolle) wurden in absteigender Konzentration zusammen mit *EGFR* überexprimierenden A431 Zellen in vollständigem Kulturmedium inkubiert. (A) Zur indirekten Immunfluoreszenz wurden die Zellen nach 30 Minuten auf Eis mit  $\text{F(ab')}_2$ -Fragmenten eines polyklonalen, FITC-konjugierten *rabbit* anti-human IgG's gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) gemessen. (B) Die Beeinflussung des Zellwachstums durch die Antikörper wurde nach 72-stündiger Inkubation im Brutschrank mittels MTS-Assay bestimmt. Jeder Punkt der Kurven repräsentiert den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten und die Fehlerindikatoren den Standardfehler des Mittelwerts. Die Sternchen (\*) markieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem unspezifischen Kontrollantikörper.

### 3.2.3 Charakterisierung Fc-vermittelter Wirkmechanismen

Hinsichtlich der direkten, Fab-vermittelten Wirkmechanismen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Antikörpervarianten. Im nächsten Schritt wurden die indirekten, Fc-vermittelten Wirkmechanismen mithilfe von Zytotoxizitätstests untersucht. Hierzu wurde ebenfalls die *EGFR* überexprimierende Zelllinie A431 mit dem Wildtyp IgG1, der I332E- und S239D/I332E-Antikörpervariante und einem Kontrollantikörper (KLH) in absteigender Konzentration und vollständigem Kulturmedium inkubiert. Als Effektorzellen dienten aus dem Blut gesunder Spender frisch isolierte mononukleäre Zellen. Es zeigte sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung der Antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) gegenüber dem Wildtyp-IgG1 bei einer niedrigeren  $\text{EC}_{50}$  für die I332E- und S239D/I332E-Variante. Während für den Wildtyp-IgG1 eine Konzentration von  $9,5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$  (95% KI:  $2,9 \times 10^{-3} - 32 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$ ) erforderlich war, um eine halbmaximale Tumorzelllyse der A431 Zellen zu induzieren, betrug die  $\text{EC}_{50}$  für die I332E-Antikörpervariante  $1,6 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$  (95% KI:  $0,39 \times 10^{-3} - 6,9 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$ ) bzw.  $0,6 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$  (95% KI:  $0,23 \times 10^{-3} - 1,5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$ ) für die S239D/I332E-Variante. Eine im Sättigungsbereich der Antikörper deutlich gesteigerte ADCC gegenüber dem Wildtyp-IgG1 konnte durch das *Fc-Engineering* nicht erzielt werden, jedoch waren die Antikörpervarianten dem Wildtyp-IgG1 hinsichtlich der Induktion



von Tumorzelllyse im unteren Konzentrationsbereich überlegen. Eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung der Antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität gegenüber dem Wildtyp-IgG1 konnte in einem Konzentrationsbereich von  $0,128 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  bis  $0,016 \mu\text{g/ml}$  für die S239D/I332E- und von  $3,2 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  bis  $0,08 \mu\text{g/ml}$  für die I332E-Antikörpervariante nachgewiesen werden (**Abb. 3-4 A**).



**Abbildung 3-4. Charakterisierung Fc-vermittelter Wirkmechanismen mittels Zytotoxizitätstest.** Zur Charakterisierung der Fc-vermittelten Wirkmechanismen wurde die Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität von A431 Tumorzellen mit (A) frisch isolierten mononukleären Zellen und (B) im Vollblut untersucht. Hierzu wurden  $^{51}\text{Cr}$ -markierte A431 Zellen zusammen mit den Antikörpern in absteigender Konzentration und den MNC's im Verhältnis Effektor-zu-Target von 80:1 bzw. mit  $50 \mu\text{l}$  Vollblut gesunder Spender für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Aktivität des freigesetzten Chrom-51 im Überstand gemessen. Jeder Punkt der Kurven repräsentiert den Mittelwert und die Fehlerindikatoren den Standardfehler des Mittelwerts von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Während die Sternchen (\*) signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zum unspezifischen Kontrollantikörper markieren, symbolisieren die Rauten signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen der (#) S239D/I332E- bzw. (#) I332E-Variante und dem Wildtyp-IgG.

Um die Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität, durch den Wildtyp-IgG1 und die durch *Fc-Engineering* optimierten Antikörpervarianten, in einem physiologischeren Hintergrund zu untersuchen, wurden die zuvor beschriebenen Zytotoxizitätstests mit dem Vollblut gesunder Spender durchgeführt. Die höchste Antikörperkonzentration betrug  $2 \mu\text{g/ml}$ , wie zuvor im Zytotoxizitätstest mit mononukleären Zellen. Im Vergleich zu den mit Kontrollantikörper behandelten A431 Zellen, konnte für den Wildtyp-IgG1 sowie die I332E- und S239D/I332E-Variante eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Tumorzelllyse beobachtet werden. Diese war jedoch hinsichtlich des maximalen Ansprechens um den Faktor 6 bis 7,5 reduziert gegenüber der Antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität durch MNC's. Die  $\text{EC}_{50}$  für den Wildtyp-IgG1 betrug  $84,5 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  sowie  $18,3 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  für die I332E-Variante und  $4,5 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  für die S239D/I332E. Des Weiteren war die S239D/I332E-Variante in einem Konzentrations-

bereich von  $3,2 \times 10^{-3}$  µg/ml bis 0,08 µg/ml sowie die I332E-Variante bei 0,016 µg/ml signifikant ( $p < 0,05$ ) effektiver in der Induktion von Tumorzelllyse verglichen mit dem Wildtyp-IgG1 (**Abb. 3-4 B**).

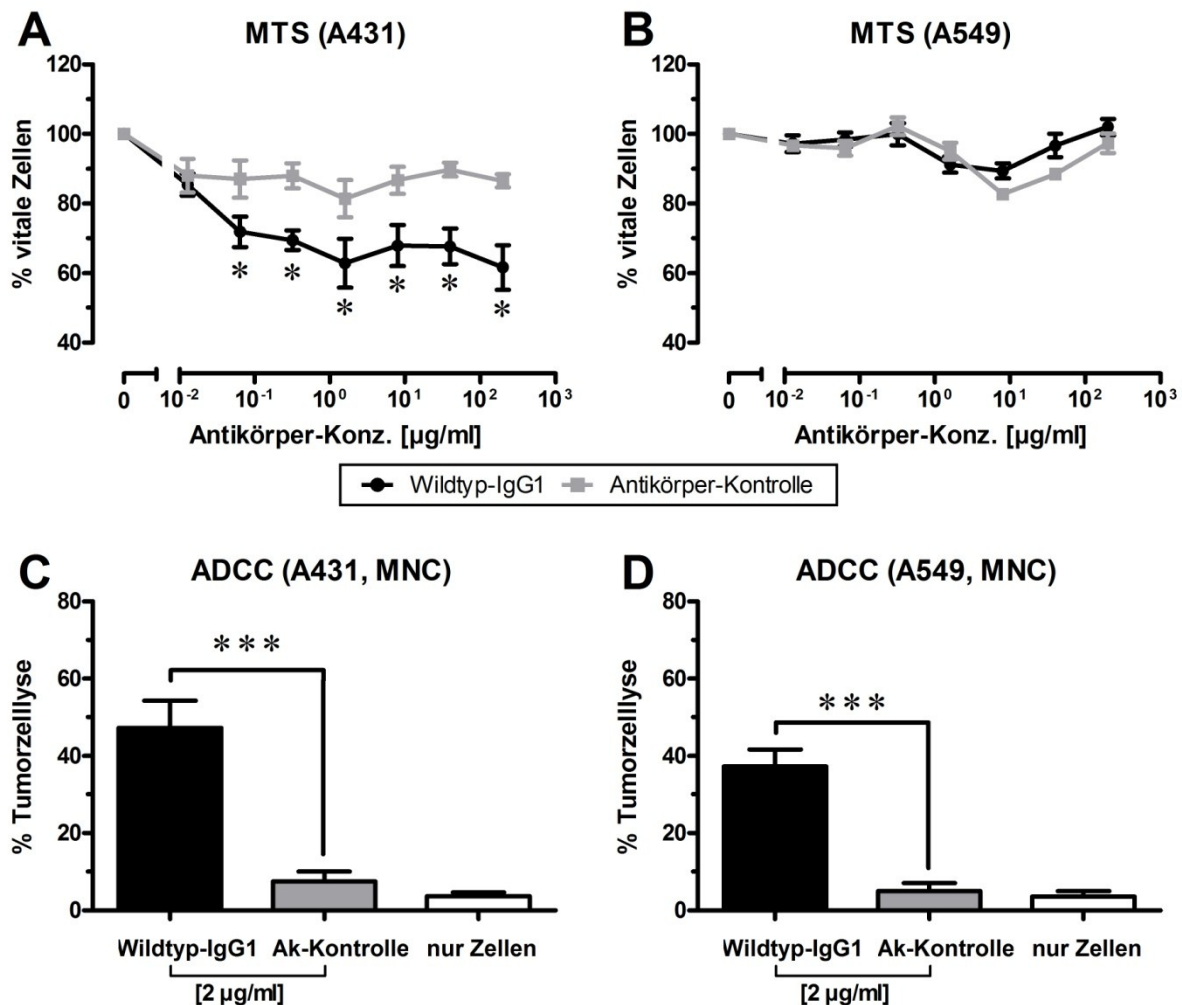
### 3.3 Wirkung humanisierter IgG1 *EGFR*-Antikörper auf Tumorzelllinien mit Mutation des *KRAS* Proteins

#### 3.3.1 Vergleich direkter und indirekter Wirkmechanismen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich die indirekten, Fc-vermittelten Wirkmechanismen von *EGFR*-Antikörpern mittels *Fc-Engineering* steigern lassen, wurde weitergehend untersucht, inwiefern sich diese Beobachtung auf Tumorzelllinien übertragen lässt, die eine mutationsbedingte konstitutive Aktivierung des *KRAS* Proteins aufweisen. Hierzu wurden zunächst die den *EGFR* überexprimierende Plattenepithelkarzinomzelllinie A431, die einen *KRAS*-Wildtyp besitzt sowie die nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie A549, die ebenfalls den *EGFR* exprimiert und eine *KRAS*<sup>(G12S)</sup> Mutation aufweist im MTS-Zellviabilitätsassay sowie ADCC-Zytotoxizitätstest untersucht. Dazu wurden die A431 oder A549 Zellen zusammen mit dem humanisierten Cetuximab (Wildtyp-IgG1) sowie einem Kontrollantikörper (KLH) in absteigender Konzentration (200 µg/ml – 0,0128 µg/ml) bzw. im Zytotoxizitätstest mit 2 µg/ml inkubiert.

Nach 72-stündiger Inkubation mit dem Wildtyp-IgG1 im MTS-Assay zeigte sich mit  $61,6 \% \pm 6,4 \%$  (Kontrolle:  $86,5 \% \pm 1,9 \%$ ) vitaler A431 Zellen bei einer Konzentration der Antikörper von 200 µg/ml eine signifikant ( $p < 0,05$ ) erniedrigte Anzahl stoffwechselaktiver Tumorzellen. Die Vitalität der A549 Zellen war bei gleicher Antikörperkonzentration mit  $102 \% \pm 2,3 \%$  (Kontrolle:  $97,3 \% \pm 2,8 \%$ ) vitaler Tumorzellen hingegen unbeeinflusst (**Abb. 3-5 A, B**). Im Zytotoxizitätstest zeigte sich jedoch eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Antikörperabhängige Tumorzelllyse beider Zelllinien durch mononukleäre Zellen. Die Antikörperunabhängige, allein durch MNC's verursachte Zytotoxizität betrug  $3,6 \% \pm 1,0 \%$  für die Zelllinie A431 bzw.  $3,6 \% \pm 1,5 \%$  für die A549. Mit 2 µg/ml Wildtyp-IgG1 wurde eine Tumorzelllyse von  $47,2 \% \pm 7,1 \%$  (Kontrolle:  $7,5 \% \pm 2,5 \%$ ) der A431 Zellen und  $37,2 \% \pm 4,4 \%$  (Kontrolle:  $5,1 \% \pm 2,0 \%$ ) der A549 Zellen beobachtet (**Abb. 3-5 C, D**).

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass sich die Zellen mit einer *KRAS*<sup>(G12S)</sup>-Mutation der NSCLC-Zelllinie A549 im Vergleich zur Referenzzelllinie A431 (*KRAS* unmutiert) nicht durch *EGFR*-Antikörper im Wachstum hemmen lassen, jedoch empfindlich gegenüber ADCC durch mononukleäre Zellen sind.



**Abbildung 3-5. Vergleich direkter und indirekter Wirkmechanismen von EGF-Rezeptor-Antikörpern auf Zelllinien mit Wildtyp-KRAS und mutiertem KRAS<sup>(G12S)</sup>.** Zur Untersuchung der direkten (A, B) und indirekten (C, D) Wirkmechanismen wurden die den EGFR überexprimierende und KRAS-Wildtyp aufweisende Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 und die nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie A549, die ebenfalls den EGFR exprimiert und eine KRAS<sup>(G12S)</sup> Mutation besitzt, untersucht. (A, B) Jeweils 5.000 Zellen beider Zelllinien wurden in vollständigem Kulturmedium zusammen mit dem Wildtyp-IgG1 und einem Kontrollantikörper (KLH) bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  bis  $12,8 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$  im Brutschrank inkubiert. Nach 72 Stunden wurde die Vitalität der Zellen mittels MTS-Assay bestimmt. (C, D) Zur Untersuchung der ADCC wurden jeweils mit <sup>51</sup>Cr-markierte Zellen beider Tumorzelllinien zusammen mit 2  $\mu\text{g/ml}$  Wildtyp-IgG1 oder Kontrollantikörper (KLH) und mononukleären Zellen bzw. nur mit MNC's (nur Zellen) im Verhältnis 80:1 inkubiert. Nach 3-stündiger Inkubation wurde die Aktivität des Radioisotops im Überstand der Zellen bestimmt und die Tumorzelllyse berechnet. Jeder Punkt der Kurve bzw. die Balken repräsentiert den Mittelwert und die Fehlerindikatoren den Standardfehler des Mittelwerts aus Triplikaten von mindestens (A, B) drei bzw. (C, D) neun unabhängigen Experimenten. Die Sternchen markieren signifikante Unterschiede (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) gegenüber dem Kontrollantikörper.

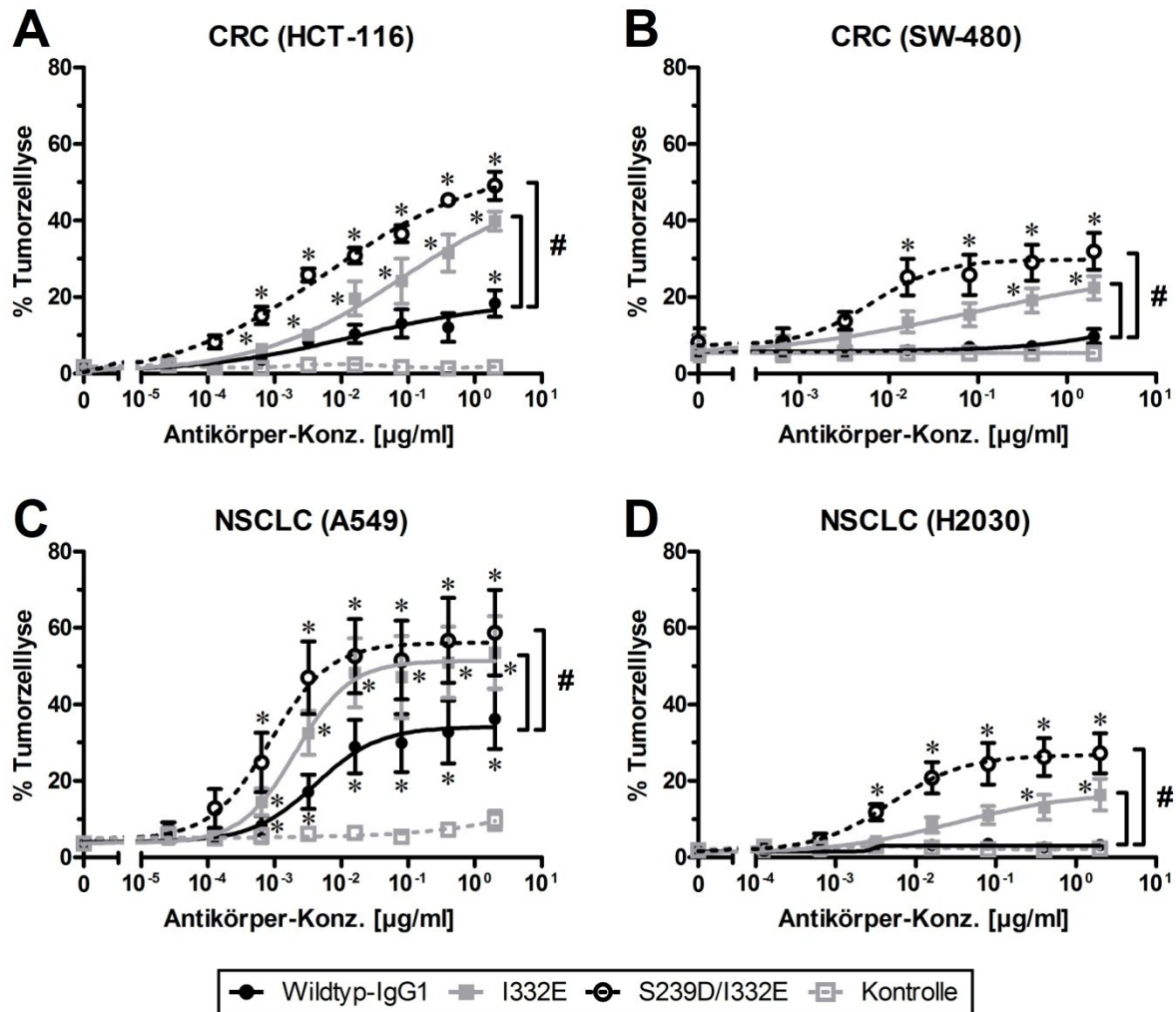
### 3.3.2 Einfluss des *Fc-Engineering* auf den ADCC von Tumorzellen mit mutiertem, konstitutiv aktivem *KRAS*

Der Einfluss des *Fc-Engineering* auf die Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität sowie das Wachstum von *KRAS*-Wildtyp exprimierenden Zellen wurde bereits an anderer Stelle in dieser Arbeit ausführlich beschrieben und gezeigt. Ob sich diese Beobachtungen, insbesondere im Hinblick auf die ADCC von Tumorzellen mit mutiertem und konstitutiv aktivem *KRAS* übertragen lassen, wurde nachfolgend untersucht. Hierzu wurden die Zelllinien A549 und H2030 (NSCLC) sowie HCT-116 und SW-480 (CRC) zusammen mit absteigenden Konzentrationen des Wildtyp-IgG1, der I332E- und S239D/I332E-Variante, dem unfucosylierten IgG1 sowie einem Kontrollantikörper (KLH) und MNC's inkubiert. Nach drei Stunden Inkubation im Brutschrank wurde in den Überständen der Versuchsansätze die Aktivität von Chrom-51 bestimmt, mit dem die Tumorzellen zuvor markiert wurden.

#### ***Protein-Engineering***

Während der Wildtyp-IgG1 bei einer im Sättigungsbereich liegenden Konzentration von 2 µg/ml gegen die CRC-Zelllinie HCT-116 mit 18,3 % ± 3,5 % (Kontrolle: 1,7 % ± 0,6 %) sowie gegen die NSCLC-Zelllinie A549 mit 36,2 % ± 7,9 % (Kontrolle: 9,7 % ± 2,5 %) eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Antikörperabhängige Tumorzelllyse aufwies, konnte diese für die Zelllinien SW-480 (CRC; Wildtyp-IgG1: 9,7 % ± 1,9 %, Kontrolle: 5,3 % ± 1,7 %) und H2030 (NSCLC; Wildtyp-IgG1: 3,2 % ± 1,0 %, Kontrolle: 2,3 % ± 0,8 %) nicht beobachtet werden. Für die Antikörpervarianten, die dem *Protein-Engineering* unterzogen wurden, zeigte sich jedoch eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität gegen alle vier untersuchten Zelllinien, die zudem gegenüber dem Wildtyp-IgG1 deutlich gesteigert war. Am deutlichsten fiel der Unterschied für die Zelllinien SW-480 und H2030 aus (**Abb. 3-6 B, D**). Mit der S239D/I332E-Variante und einer Konzentration von 2 µg/ml konnte eine Tumorzelllyse von 31,9 % ± 4,9 % der SW-480 Zellen sowie von 27,2 % ± 5,3 % der Zelllinie H2030 erzielt werden. Etwas geringer fiel diese mit der I332E-Variante aus und betrug bei ebenfalls 2 µg/ml Antikörper 22,4 % ± 3,1 % für die Kolonkarzinomzelllinie SW-480 und 16,4 % ± 4,1 % für die H2030 Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. Gegen die Zelllinien HCT-116 (CRC) und A549 (NSCLC) wies die S239D/I332E-Variante bei einer Konzentration von 2 µg/ml eine Tumorzelllyse von 49,1 % ± 3,7 % bzw. 58,7 % ± 11,2 % auf. Für die Antikörpervariante I332E wurde bei gleicher Konzentration eine ADCC von 39,8 % ± 2,5 % (HCT-116) und von 53,6 % ± 9,6 % (A549) beobachtet (**Abb. 3-6 A, C**). Weiterhin zeigte sich die S239D/I332E-Antikörpervariante signifikant ( $p < 0,05$ ) effektiver gegenüber der I332E-Variante bei einer Konzentration von  $0,13 \times 10^{-3}$  µg/ml bis 0,016 µg/ml gegen die CRC-Zelllinie HCT-116 sowie bei einer Konzentration von  $3,2 \times 10^{-3}$  µg/ml bis 2 µg/ml gegen die NSCLC-Zellen H2030

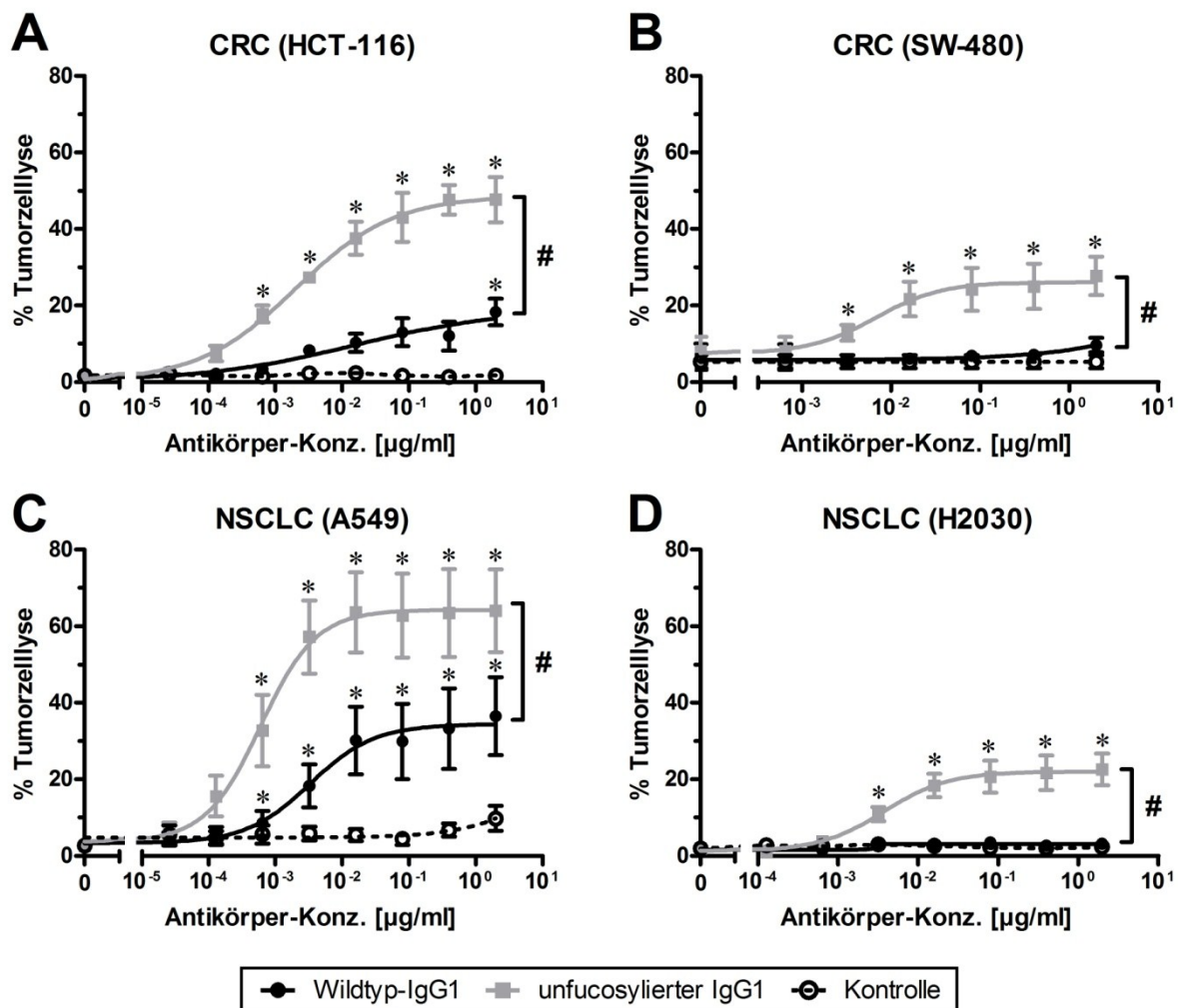
(Abb. 3-6 A, D; signifikante Unterschiede zwischen den Antikörpervarianten wurden nicht dargestellt).



**Abbildung 3-6. Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität von Tumorzelllinien mit mutiertem *KRAS* und Antikörpern mit Fc-Mutationen durch *Protein-Engineering*.** Untersucht wurde die ADCC-Aktivität der mittels *Protein-Engineering* modifizierten Antikörper gegen Tumorzelllinien mit mutiertem, konstitutiv aktivem *KRAS*. Hierzu wurden (A, B) Kolonkarzinom- (CRC) und (C, D) nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzelllinien (NSCLC) verwendet. Die Tumorzellen wurden mit Chrom-51 markiert und zusammen mit den Antikörpern in absteigender Konzentration sowie frisch isolierten mononukleären Zellen im Verhältnis 80:1 bei 37 °C inkubiert. Nach 3 Stunden wurde die Aktivität des Radioisotops Chrom-51 im Überstand des Versuchsansatzes bestimmt, das durch die abgestorbenen Tumorzellen freigesetzt wurde. Jeder Punkt der Kurven repräsentiert den Mittelwert und die Fehlerindikatoren den Standardfehler des Mittelwerts von mindestens vier unabhängigen Experimenten. Signifikante ( $p < 0,05$ ) Tumorzelllysen verglichen mit dem Kontrollantikörper sind durch ein Sternchen (\*) gekennzeichnet. Die Rauten (#) kennzeichnen signifikante ( $p < 0,05$ ) Unterschiede der mit einer Klammer (]) verbundenen Antikörpervarianten zum Wildtyp-IgG1 bei maximaler Antikörperkonzentration (2 µg/ml).

### Glyco-Engineering

Nachdem, wie zuvor dargestellt, die ADCC-Aktivität der *Protein-engineerten EGFR*-Antikörper gegen *KRAS*-mutierte Tumorzelllinien betrachtet wurde, waren im nächsten Schritt die Auswirkungen der Defucosylierung des Wildtyp-IgG1 auf den ADCC von CRC- und NSCLC-Zelllinien Gegenstand weiterer Untersuchungen. Hierzu wurden die einleitend beschriebenen Zytotoxizitätstests in gleicher Weise durchgeführt, um den unfucosylierten IgG1 mit dem Wildtyp-IgG1 zu vergleichen.



**Abbildung 3-7. Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität von Tumorzelllinien mit mutiertem *KRAS* und einem im Fc-Teil unfucosylierten IgG1-Antikörper.** Der Einfluss des *Glyco-Engineering* vom Wildtyp-IgG1 auf die ADCC von *KRAS* mutierten (A, B) Kolon- und (C, D) nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien wurde mithilfe von Zytotoxizitätstests untersucht. Diese wurden wie zuvor bereits beschrieben durchgeführt. Jeder Punkt der Kurven repräsentiert den Mittelwert und die Fehlerindikatoren den Standardfehler des Mittelwerts von vier unabhängigen Experimenten. Signifikante ( $p < 0,05$ ) Tumorzelllysen verglichen mit dem Kontrollantikörper sind durch ein Sternchen (\*) gekennzeichnet. Die Rauten (#) kennzeichnen signifikante ( $p < 0,05$ ) Unterschiede des unfucosylierten IgG1 zum Wildtyp-IgG1 bei maximaler Antikörperkonzentration. CRC: Kolorektales Karzinom, NSCLC: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom.

Die mit dem Wildtyp-IgG1 beobachteten Tumorzelllysen gegen die Kolonkarzinomzelllinien HCT-116 und SW-480 sowie die Zelllinien eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms A549 und H2030 waren identisch mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen im Zusammenhang mit den durch *Protein-Engineering* modifizierten Varianten. Bezüglich des unfucosylierten IgG1 Antikörpers zeigten sich jedoch gegen alle vier Zelllinien ein signifikant ( $p < 0,05$ ) besserer ADCC verglichen mit dem Wildtyp-IgG1. Die bei 2 µg/ml unfucosyliertem IgG1 erzielten Tumorzelllysen betrugen  $47,7 \% \pm 6,0 \%$  und  $27,7 \% \pm 5,1 \%$  der CRC-Zelllinien HCT-116 bzw. SW-480 sowie  $64,1 \% \pm 10,8 \%$  und  $22,6 \% \pm 4,1 \%$  der NSCLC-Zelllinien A549 bzw. H2030 (**Abb. 3-7**). Weiterhin zeigte sich, dass der unfucosylierte IgG1 in einem Konzentrationsbereich von  $0,64 \times 10^{-3}$  µg/ml bis 2 µg/ml gegen die CRC-Zelllinie HCT-116 und NSCLC-Zelllinie A549 signifikant ( $p < 0,05$ ) besser war als der Wildtyp-IgG1 (**Abb. 3-7 A, C**), und gegen die Zelllinien SW-480 (CRC) sowie H2030 (NSCLC) in einem Konzentrationsbereich von  $3,2 \times 10^{-3}$  µg/ml bis 2 µg/ml (**Abb. 3-7 B, D**).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Modifikation des Fc-Fragments von *EGFR*-Antikörpern mittels *Protein-* bzw. *Glyco-Engineering*, die ADCC-Aktivität gegen *KRAS*-mutierte Tumorzellen verschiedener Entitäten, verglichen mit einem nicht optimierten *EGFR*-Antikörper (Wildtyp-IgG1), signifikant gesteigert werden konnte (**Abb. 3-6 und Abb. 3-7**). Ferner wurde gezeigt, dass durch die Optimierung des Fc-Fragments von *EGFR*-Antikörper eine signifikante Tumorzelllyse von *KRAS*-mutierten Tumorzellen zu erzielen war, obwohl diese zuvor von einem nicht optimierten *EGFR*-Antikörper und mononukleären Zellen nicht mittels ADCC abzutöten waren (**Abb. 3-6 B, D und Abb. 3-7 B, D**).

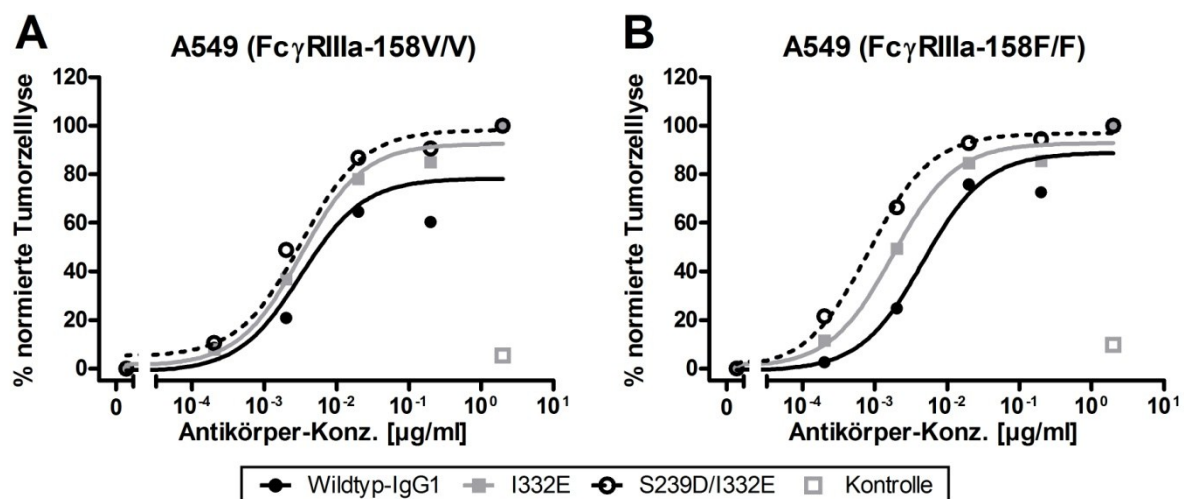
### 3.3.3 MNC-vermittelte Antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität in Abhängigkeit vom FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus

Nachdem der Einfluss des *Fc-Engineering* humaner IgG1 *EGFR*-Antikörper auf die ADCC von *KRAS*-mutierten Tumorzellen dargestellt wurde, wird nachfolgend betrachtet werden, inwiefern die ADCC mononukleärer Zellen vom 158V/F-Polymorphismus des FcγRIIIa abhängig ist. Hierzu wurden Zytotoxizitätstests mit der NSCLC-Zelllinie A549 und dem Wildtyp-IgG1, der I332E- sowie S239D/I332E-Variante durchgeführt, die den Tumorzellen in absteigender Konzentration hinzugefügt wurden. Es wurden die konzentrationsabhängigen Unterschiede bezüglich der ADCC mit FcγRIIIa-158V/V bzw. -158F/F exprimierenden mononukleären Zellen von jeweils zwei gesunden Blutspendern untersucht. Hierzu wurden die aufgenommenen Dosis-Wirkungskurven normiert und die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) der Antikörper bestimmt.

Für die den FcγRIIIa-158V/V-Allotyp exprimierenden mononukleären Zellen zeigte sich nahezu eine Halbierung der  $EC_{50}$ -Werte mit steigender Affinität der Antikörper zum FcγRIIIa,



beginnend beim Wildtyp-IgG1 mit  $7,1 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  (95 % Konfidenzintervall [95 % KI]:  $1,7 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml} - 29,5 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ ) über die I332E-Variante mit  $3,3 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  (95 % KI:  $1,7 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml} - 6,3 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ ) bis hin zur S239D/I332E-Variante mit  $1,9 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  (95 % KI:  $1,3 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml} - 2,9 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ ) (**Abb. 3-8 A**). Ein ähnliches Resultat wurde mit mononukleären Zellen beobachtet, die den Fc $\gamma$ R1IIa-158F/F-Allotyp exprimierten. Hier betrug die Konzentration des Wildtyp-IgG1  $4,6 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  (95 % KI:  $2,3 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml} - 9,2 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ ), um einen halbmaximalen Effekt gegen die A549 Zellen zu erzielen. Die mittlere effektive Konzentration der S239D/I332E-Variante war mit  $0,83 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  (95 % KI:  $0,59 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml} - 1,2 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ ) ebenfalls um etwa die Hälfte niedriger als die EC<sub>50</sub> der I332E-Variante mit  $1,8 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  (95 % KI:  $1,2 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml} - 2,6 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ ) (**Abb. 3-8 B**). Im Ergebnis zeigte sich somit eine Verbesserung der ADCC durch die Fc-optimierten EGFR-Antikörper gegenüber dem nicht optimierten Wildtyp-IgG1, unabhängig vom 158V/F-Polymorphismus des, vor allem auf NK-Zellen exprimierten, Fc $\gamma$ R1IIa.



**Abbildung 3-8. Konzentrationsabhängige Tumorzelllyse von A549 NSCLC Zellen in Abhängigkeit vom Fc $\gamma$ R1IIa Allotyp auf mononukleären Zellen.** Der Wildtyp-IgG1 und die Antikörpervarianten (I332E, S239D/I332E) wurden in absteigender Konzentration und KLH als Isotypenkontrolle mit  $2 \mu\text{g/ml}$  zu den A549 Zellen gegeben. Nach Zugabe mononukleärer Zellen im Verhältnis (E:T) 80:1, die entweder den (A) Fc $\gamma$ R1IIa-158V/V oder (B) -158F/F exprimierten, wurde der Versuchsansatz für drei Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität von Chrom-51 im Überstand bestimmt, die Tumorzelllyse berechnet und normiert dargestellt. Jeder Punkt der Kurve repräsentiert den Mittelwert von Triplikaten jeweils zwei unabhängiger Experimente mit typisierten mononukleären Zellen gesunder Blutspender.



## 4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkmechanismen humanisierter *EGFR*-Antikörper untersucht, deren Affinität zum humanen  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  mittels *Fc-Engineering* erhöht wurde. Es war zu klären, inwiefern sich diese Antikörper von einem herkömmlichen *EGFR*-Antikörper vom IgG1 Isotyp in ihrer Wirkung unterscheiden und ob ihre Wirksamkeit von genetischen Veränderungen der Tumorzellen, insbesondere Mutationen von *KRAS*, beeinflusst werden. Hierzu wurden die Wirkmechanismen der Antikörpervarianten in Zytotoxizitäts- und Wachstumsinhibitionsversuchen mit einer humanisierten Variante des Antikörpers Cetuximab verglichen sowie an verschiedenen *in vitro* kultivierten Tumorzelllinien studiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich Zelllinien des kolorektalen Karzinoms sowie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, die eine Mutation von *KRAS* aufweisen, mittels Antikörperabhängiger zellulärer Zytotoxizität durch einen humanisierten *EGFR*-Antikörper vom IgG1 Isotyp, *in vitro* abtöten lassen.

### 4.1 Auswahl und Charakterisierung der untersuchten Zelllinien

Für die vorliegende Untersuchung wurden Tumorzelllinien des kolorektalen Karzinoms sowie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms aus der Datenbank des *Cancer Genome Project* ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)) ausgewählt, die eine Mutation von *KRAS* aufweisen. Diese Mutationen werden in circa 30-40 % der kolorektalen Karzinome (11) sowie in circa 20-30 % der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (115) gefunden. Der Nachweis einer Mutation im Codon 12 bzw. 13 des *KRAS*-Gens ist nach aktueller wissenschaftlicher Meinung ein unabhängiger, ungünstiger prognostischer Marker für den Therapieerfolg des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms mit den *EGFR*-Antikörpern Cetuximab und Panitumumab (40). Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass Patienten mit einer Mutation im Codon 13 des *KRAS*-Gens ein deutlich besseres Therapieansprechen haben verglichen mit jenen, die Mutationen im Codon 12 aufweisen (116). Ferner gelten dieselben Mutationen als ungünstiger prognostischer Marker für die Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms mit den Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Erlotinib (117, 118), wohingegen dieser Zusammenhang für das Ansprechen auf Cetuximab nicht nachgewiesen werden konnte (54).

Aktiviertes *RAS* lässt sich in Zellen mithilfe eines von Chiu *et al.* entwickelten Fusionsproteins nachweisen, das aus der Ras-Bindungsdomäne (RBD) von Raf-1 besteht, gekoppelt mit einem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) (119). Dieses Fusionsprotein gebunden an Agarosebeads (vgl. Abschnitt 2.5) wurde verwendet um konstitutiv aktiviertes *RAS* aus den

hier untersuchten Tumorzelllinien zu präzipitieren. Der Nachweis von aktiviertem *RAS* im Präzipitat sowie des gesamten *RAS*-Proteins im nativen Proteinextrakt, erfolgte mithilfe eines *RAS*-spezifischen Antikörpers im Western-Blot. Hierbei hat sich gezeigt, dass in den CRC- und NSCLC-Zelllinien im Vergleich zur Referenzzelllinie A431 mehr aktiviertes *RAS*-Protein nachzuweisen war, wohingegen die Gesamtmenge des in den Zellen exprimierten *RAS*-Proteins annähernd gleich zu sein schien (**Abb. 3-1**).

*KRAS* wird durch die Bindung des Nukleosidtriphosphats GTP aktiviert. Die Dauer der Aktivierung und damit die Rekrutierung weiterer Effektoren der Signalkaskade sind abhängig von der Aktivität der intrinsischen GTPase, die das GTP zum GDP hydrolysiert und damit *KRAS* in den Grundzustand zurückversetzt. Aufgrund der niedrigen Hydrolyserate der intrinsischen GTPase, interagiert *KRAS* mit sogenannten GTPase-aktivierenden Proteinen, wodurch die Hydrolyse des GTP um den Faktor Tausend gesteigert wird (26). Infolge einer Mutation, die zu einer Substitution des Glycins durch jede beliebige andere Aminosäure (außer Prolin) an Position 12 oder 13 im *KRAS*-Protein führt, wird die GAP-abhängige Hydrolyse vom GTP verhindert (24). Dadurch resultiert ein konstitutiv aktiviertes *KRAS*, das permanent die Effektoren der Signalkaskade rekrutiert und somit Wachstumssignale ins Zellinnere weiterleitet (26). Insofern ist davon auszugehen, dass in den untersuchten Tumorzelllinien, der in der Datenbank des *Cancer Genome Project* beschriebene Mutationsstatus von *KRAS* hier offensichtlich mit einer konstitutiven Aktivierung des Proteins verbunden ist.

Ein weiterer Aspekt ist die Expression des Zielantigens (*EGFR*) auf den Tumorzellen. Die hier untersuchten Tumorzelllinien wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz im Durchflusszytometer quantifiziert und die Anzahl der exprimierten Moleküle pro Zellen anhand eines Standards errechnet. Hierzu diente der von Poncelet *et al.* (120) entwickelte „Quantitative indirekte Immunfluoreszenz Assay“, der von der Firma Dako als Qifikit® vertrieben wird. Es zeigte sich die aus der Literatur bekannte hohe Anzahl von *EGFR* auf der Referenzzelllinie A431 (106) sowie eine um den Faktor 10 bzw. 40 niedrigere Expression auf den NSCLC- bzw. CRC-Zelllinien (**Tab. 3-1**).

Es ist bekannt, dass schätzungsweise ein Drittel aller soliden Tumore den *EGF*-Rezeptor exprimieren (4), darunter ca. 25-75 % der kolorektalen Karzinome sowie ca. 40-80 % der nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (18). Dennoch profitieren nicht alle Patienten von einer *EGFR*-gerichteten Antikörpertherapie (121, 122). Andererseits wird berichtet, dass bei Patienten mit einem *EGFR*-negativen kolorektalen Karzinom ein objektives Ansprechen auf Cetuximab nachgewiesen werden konnte (11). In den meisten dieser Studien wurde die *EGFR*-Expression mittels Immunhistochemie bestimmt. Diese Methode ist jedoch anfällig für äußere Störeinflüsse und besitzt darüber hinaus eine geringe Sensitivität, sodass falsch negative Ergebnisse bzw. ein Unterschätzen der *EGFR*-Expression wahrscheinlich sind (11,

113). Insofern überrascht es nicht, dass der Zusammenhang zwischen immunhistochemisch bestimmter *EGFR*-Expression und dem Ansprechen auf eine *EGFR*-gerichtete Antikörpertherapie bisher zu widersprüchlichen Aussagen geführt hat (11). Aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl von Tumorzelllinien, die in dieser Arbeit hinsichtlich der *EGFR*-Expression untersucht wurden, kann ein eindeutiger Zusammenhang zwischen *EGFR*-Expression und dem Ansprechen auf die Antikörper hier nicht hergestellt werden. Auffällig war jedoch, dass es zwischen den einzelnen Tumorentitäten einen Unterschied in der *EGFR*-Expression gab. So war die Anzahl von exprimierten *EGFR*-Molekülen pro Zelle auf den CRC-Zelllinien ca. 75 % niedriger verglichen mit den NSCLC-Zellen (**Tab. 3-1**). Ob es sich bei diesem Ergebnis um ein Charakteristikum der einzelnen Tumorentitäten handelt wird an anderer Stelle und mit einer größeren Anzahl von Proben zu klären sein. Eine schlüssige Erklärung dieser Beobachtung ergibt sich auch nach umfangreicher Literaturrecherche hier jedoch nicht.

## 4.2 Charakterisierung der *EGFR*-Antikörpervarianten

Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Untersuchung von Antikörpervarianten, deren Fc-Fragment mittels *Fc-Engineering* optimiert wurde. Um zunächst zu klären, inwiefern sich diese Veränderungen auf die Funktionalität der Antikörpermoleküle auswirken, wurden diese hinsichtlich der Fab- und Fc-vermittelten Eigenschaften untersucht. Erste Untersuchungen zu den Bindungseigenschaften der Fab-Fragmente am *EGF*-Rezeptor auf *EGFR*-überexprimierenden A431-Zellen zeigten in der Durchflusszytometrie keine Unterschiede hinsichtlich der Affinität der Antikörper zum Zielantigen (**Abb. 3-3 A**). Darüber hinaus ließen sich mit den untersuchten Antikörpervarianten die Zellen der Tumorzelllinie A431 im Wachstum inhibieren. Hierzu wurden die Antikörper in absteigender Konzentration zusammen mit den Tumorzellen über 72 Stunden in vollständigem Kulturmedium inkubiert. Sowohl der Wildtyp-IgG1 als auch die *Fc-Engineerten* Antikörpervarianten waren hierbei gleich effektiv (**Abb. 3-3 B**). Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich hinsichtlich der Fc-vermittelten Wirkmechanismen, speziell bei der ADCC mit mononukleären Zellen und Vollblut (**Abb. 3-4**). Hier waren die *Fc-Engineerten* Antikörpervarianten insbesondere im niedrigeren Konzentrationsbereich signifikant effektiver in der Induktion von ADCC als der Wildtyp-IgG1. Es fiel jedoch auf, dass die ADCC mit Vollblut deutlich schwächer war als mit mononukleären Zellen. Ähnliche Ergebnisse konnten mit polymorphnukleären Zellen beobachtet werden, der Gesamtheit aller Granulozyten. Interessanterweise war der Wildtyp-IgG1 hier signifikant effektiver als die *Fc-Engineerten* Antikörper (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung dieses Befundes liefert die Analyse der Affinität des Antikörper Fc-Fragments zum FcγRIIIa sowie FcγRIIIa und dessen polymorphen Formen. Hier ließ sich im Vergleich zum Wildtyp-IgG1 eine erhöhte Affinität der

Antikörpervarianten zum Fc $\gamma$ R11a dokumentieren, während sich die Affinität zum Fc $\gamma$ R11a nur unwesentlich veränderte (**Tab. 3-2**). NK-Zellen, die innerhalb der MNC-Population neben den Monozyten und Makrophagen hauptsächlich an der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität von Tumorzellen beteiligt sind, exprimieren als einzigen Fc Rezeptor den Fc $\gamma$ R11a. Im Gegensatz dazu wird auf unstimulierten Granulozyten der Fc $\gamma$ R11a und Fc $\gamma$ R11b exprimiert (89). Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass MNC-vermittelte ADCC hauptsächlich über die Interaktion mit dem Fc $\gamma$ R11a erfolgt, während PMNs zur Antikörper-abhängigen Zytotoxizität über den Fc $\gamma$ R11a stimuliert werden (93, 105). Da die Affinität der Antikörpervarianten zugunsten des Fc $\gamma$ R11a verbessert wurde, erklärt dies die Verbesserung der ADCC mit mononukleären Zellen. Des Weiteren unterscheiden sich der Fc $\gamma$ R11a und Fc $\gamma$ R11b in ihrer extrazellulären Domäne lediglich in zwei Aminosäuren (88), sodass eine Verbesserung der Affinität der Antikörpervarianten zum Fc $\gamma$ R11a vermutlich auch deren Affinität zum Fc $\gamma$ R11b erhöht. Dieser ist auf der Zelloberfläche von Granulozyten mittels eines GPI-Ankers befestigt und verfügt über kein intrazelluläres Signalmotif. Daher stellt der Fc $\gamma$ R11b auf Granulozyten kein zytotoxisches Triggermolekül dar (89, 123). Dies erklärt, weshalb die Antikörpervarianten mit Granulozyten als Effektorzellen dem Wildtyp-IgG1 deutlich unterlegen waren. Derselbe Sachverhalt erklärt die schwache Tumorzelllyse im Vollblut, da hier physiologischerweise ca. 50-60 % der Leukozyten Granulozyten sind. Die signifikant bessere ADCC-Aktivität im unteren Konzentrationsbereich der Antikörpervarianten im Vollblut deutet jedoch auf eine effektive Beteiligung von Fc $\gamma$ R11a-exprimierenden Zellen hin, wie zum Beispiel der NK-Zellen. Ferner muss berücksichtigt werden, dass in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl im peripheren Blut das Effektor-zu-Tumorzellverhältnis im Vollblut deutlich niedriger ist als in den Versuchen mit aufgereinigten MNCs oder PMNs.

Weiterhin wurde untersucht inwiefern sich die Polymorphismen der Fc $\gamma$  Rezeptoren, insbesondere der 158V/F-Polymorphismus des Fc $\gamma$ R11a, auf die Bindungseigenschaften der verwendeten IgG1 Antikörpervarianten auswirken. Durch eine Punktmutation im FCGR3A-Gen kommt es zur Ausbildung unterschiedlicher Allele, die entweder für ein Valin (V) oder Phenylalanin (F) an Position 158 des Fc $\gamma$ R11a kodieren. Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, dass IgG1 *in vitro* mit einer höheren Affinität am Fc $\gamma$ R11a-158V bindet als am Fc $\gamma$ R11a-158F (88, 124). Dieses Ergebnis zeigte sich erwartungsgemäß auch für die hier untersuchten Antikörper, deren Bindungseigenschaften am Fc $\gamma$ R11a und dessen Allotypen (Fc $\gamma$ R11a-158V und Fc $\gamma$ R11a-158F) mittels BIACORE<sup>TM</sup>-Technik ermittelt wurden (**Tab. 3-2**). Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass sich die Affinität von IgG1-Antikörpern zum Fc $\gamma$ R11a mit einem Phenylalanin an Position 158 sowohl durch *Protein-* als auch *Glycoengineering* zum Teil um den Faktor >30 steigern lässt. Dies ist von besonderem Interesse, da die klinische Relevanz dieses Polymorphismus bereits in einer Reihe von Studien gezeigt werden

konnte. Beispielsweise zeigten Patientinnen bzw. Patienten mit einem HER2/*neu*-positiven metastasierten Karzinom der Mamma bzw. einem *EGFR*-positiven metastasierten Kolonkarzinom und einem Fc $\gamma$ RIIIa-158V/V Genotyp ein besseres objektives Ansprechen sowie ein längeres progressionsfreies Überleben auf die Therapie mit Trastuzumab bzw. Cetuximab als diejenigen mit einem Fc $\gamma$ RIIIa-158F/F Genotyp (12, 87). Diese Unterschiede lassen sich durch das *Engineering* des Antikörper Fc-Fragments minimieren. Dies zeigen nicht nur die hier dargestellten Ergebnisse (**Tab. 3-2, Abb. 3-8**), sondern auch die Auswertung der Daten einer Phase I Studie mit dem humanisierten, *Fc-engineerten* IgG1 *EGFR*-Antikörper RG7160 (GA201). Im Rahmen der Studie sollte die Sicherheit, Effektivität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von GA201 untersucht werden. Hierbei zeigten sich bei einem bzw. zwei der 75 eingeschlossenen Patienten eine komplette bzw. eine partielle Remission und eine Stabilisierung der Erkrankung bei 27 Patienten. Diese Ergebnisse waren unabhängig vom Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F Polymorphismus der Probanden (125).

### 4.3 Wirksamkeit humanisierter IgG1 *EGFR*-Antikörper gegen CRC- und NSCLC-Zelllinien mit *KRAS*-Mutation

#### 4.3.1 Vergleich direkter und indirekter Wirkmechanismen

Wie zuvor bereits dargestellt und diskutiert wurde, ist der beschriebene Mutationsstatus von *KRAS* in den untersuchten CRC- und NSCLC-Zelllinien offensichtlich mit einer konstitutiven Aktivierung des Proteins verbunden. Ferner wurde gezeigt, dass durch das *Engineering* des Antikörper Fc-Fragments, dessen Affinität zum Fc $\gamma$ RIIIa sowie die ADCC-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-IgG1 deutlich gesteigert wurde, die Funktion des Fab-Fragments jedoch unbeeinflusst war. Inwiefern sich diese Befunde auf die Wirkung der *EGFR*-Antikörper auswirken, wurde zunächst anhand der Tumorzellvitalität nach Inkubation in Kulturmedium und in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen eines humanisierten IgG1 *EGFR*-Antikörpers untersucht. Hierzu wurden die NSCLC-Zellen A549 mit der Referenzzelllinie A431 verglichen. Es zeigte sich, dass nach 72-stündiger Inkubation mit der höchsten Antikörperkonzentration die Vitalität der A431-Zellen signifikant abgenommen hatte, während die Vitalität der A549-Zellen unverändert blieb (**Abb. 3-5 A, B**). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Hypothese, dass *KRAS*-Mutationen zu einer Aktivierung nachgeschalteter Signalwege führen und damit die Signaltransduktion über den Wachstumsfaktor-Rezeptor entbehrlich ist und folglich dessen Inhibition unwirksam (11).

Durch die Interaktion des Antikörper Fc-Fragments mit Fc $\gamma$  Rezeptoren können diese jedoch weitere Wirkmechanismen entfalten, wodurch die Tumorzellen mittels ADCC abgetötet werden (9). Diese zytotoxische Wirkung wurde in weiteren Versuchen sowohl gegen die *KRAS*-

mutierte Zelllinie A549 als auch gegen die Referenzzelllinie A431 untersucht, die aufgrund ihrer hohen *EGFR*-Expression besonders empfindlich gegenüber ADCC ist. Hier wurde im Vergleich zu einem Kontrollantikörper eine signifikante Tumorzelllyse sowohl der A431- als auch der A549-Zellen beobachtet (**Abb. 3-5 C, D**). Dies zeigt, dass das Vorhandensein einer *KRAS*-Mutation nicht generell eine Resistenz gegenüber *EGFR*-Antikörpern bewirkt. Andererseits geht man davon aus, dass die Inhibition von *EGFR*-vermittelten Signalen der vorherrschende Wirkmechanismus dieser Antikörper *in vivo* ist, sodass folglich aktivierende Mutationen von nachgeschalteten Signalmolekülen, wie beispielsweise von *KRAS*, *BRAF* und *PI3K*, die Resistenz von Tumorzellen gegenüber *EGFR*-Inhibitoren fördern (126, 127). Dieser Hypothese widerspricht jedoch die Auswertung der FLEX-Studie, einer großen, multizentrischen, randomisierten Phase III Studie zur Therapie des fortgeschrittenen NSCLC mit Platin-haltiger Chemotherapie und Cetuximab (6). Hierbei konnte ein längeres Überleben für die Patienten gezeigt werden, die neben einer konventionellen Platin-haltigen Chemotherapie Cetuximab erhalten hatten. Interessanterweise war dieser Effekt unabhängig von einer *KRAS*-Mutation, die bei 19 % der behandelten Patienten nachgewiesen wurde (54). Eine Erklärung für diese Beobachtung steht zurzeit noch aus. Es wird jedoch diskutiert, ob die Art des Mutationsereignisses im Codon 12 / 13 des *KRAS*-Gens (üblicherweise ein Wechsel von Guanin zu Thymin beim NSCLC bzw. Guanin zu Adenin beim CRC) hierfür ursächlich ist (54). Eine weitere Hypothese stützt sich auf die unterschiedlichen Signaltransduktionswege, die beim CRC bzw. NSCLC durch eine *KRAS*-Mutation aktiviert werden. Während die Aktivierung der Signaltransduktion über die *MAP*-Kinase hauptsächlich durch *RAS* erfolgt, kann die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (*PI3K*) sowohl über *RAS* als auch unabhängig von *RAS* erfolgen. Insofern wird davon ausgegangen, dass in kolorektalen Karzinomen die Aktivierung sowohl der *MAPK* als auch der *PI3K* durch den *EGF*-Rezeptor hauptsächlich über *RAS* erfolgt, während die Aktivierung der *PI3K* in Lungenkarzinomen für gewöhnlich *RAS*-unabhängig ist (53).

#### **4.3.2 Einfluss des *Fc-Engineering* auf den ADCC von *KRAS*-mutierten CRC- und NSCLC-Zelllinien**

Es wurde weiterhin untersucht, inwiefern sich die Zytotoxizität gegen die *KRAS*-mutierten Tumorzellen mithilfe von *EGFR*-Antikörpern verbessern ließ, deren Fc-Fragment mittels *Fc-Engineering* modifiziert wurde. Hierzu wurden im Zytotoxizitätstest neben der *KRAS*-mutierten Zelllinie A549 eine weitere NSCLC-Zelllinie (NCI-H2030) sowie zwei CRC-Zelllinien (HCT-116 und SW-480) untersucht, die ebenfalls eine *KRAS*-Mutation aufweisen. Es zeigte sich, dass neben den A549- auch die HCT-116-Zellen empfindlich gegenüber ADCC mit der humanisierten IgG1-Variante von Cetuximab (Wildtyp-IgG1) und mononukle-

ären Zellen waren, die SW-480- und H2030-Zellen jedoch nicht. Diese scheinbare ADCC-Resistenz konnte jedoch durch die *Fc-engineerten* Antikörpervarianten überwunden werden, deren Affinität zum Fc $\gamma$ R11a, verglichen mit dem Wildtyp-IgG1, deutlich erhöht war. Hierbei zeigte sich nicht nur eine signifikante Steigerung der ADCC-Aktivität gegen die HCT-116- und A549-Zellen, verglichen mit dem Wildtyp-Antikörper, sondern auch ein signifikanter ADCC der SW-480- und H2030-Zellen (**Abb. 3-6 und 3-7**). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Wirksamkeit von *EGFR*-Antikörpern gegen Tumorzellen mit nachgewiesener *KRAS*-Mutation durch das *Engineering* des Fc-Fragments verbessern lässt. Paz-Ares *et al.* berichteten hierzu erst kürzlich, dass ein *glykoengineerter* IgG1 *EGFR*-Antikörper auch *in vivo* das Outcome von Patienten mit einem fortgeschrittenen soliden *EGFR*-positiven Tumor verbesserte, auch wenn dieser eine *KRAS*-Mutation beherbergt (125).

Weitere Unterstützung für die Beteiligung Fc-vermittelter Effektormechanismen an der Effizienz von *EGFR*-Antikörpern stammt aus statistischen Korrelationsanalysen zwischen Fc $\gamma$  Rezeptor Allotypen und dem klinischen Therapieansprechen (12). Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass Fc-vermittelte Effektorfunktionen für die klinische Effizienz von Cetuximab bei Patienten mit einem Kolorektalen Karzinom relevant wären, wie dies in der Vergangenheit auch für andere therapeutisch zugelassene Antikörper gezeigt werden konnte (85-87). Wesentlich ist hierbei auch, dass einzelne Patienten mit einem günstigen Fc $\gamma$ -Rezeptor Allotypen (Fc $\gamma$ R11a-131H und/oder Fc $\gamma$ R11a-158V) auf eine Therapie mit Cetuximab ansprachen, obwohl ihr Tumor eine onkogene *KRAS*-Mutation aufwies (12). Diesbezüglich wurde von Lazar *et al.* berichtet, dass *Fc-Engineering* den ADCC von Fc $\gamma$ R11a-158F/F, -158F/V und -158V/V Spendern verbesserte (97). Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass ein Großteil der Antikörper-vermittelten Tumorzelllyse sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) verursacht wird (77). Diese gehören als eine Subpopulation der Lymphozyten definitionsgemäß den mononukleären Zellen an und exprimieren überwiegend den humanen Fc $\gamma$ R11a (90). Daher weist die Verbesserung der ADCC mit den durch *Fc-Engineering* modifizierten Antikörpern auf eine effektivere Rekrutierung von NK-Zellen hin. Dies zeigte sich auch in der Phase I Studie mit dem *glykoengineerten* IgG1 GA201. Hier wurde nach Applikation des Antikörpers eine Reduktion der im peripheren Blut zirkulierenden NK-Zellen beobachtet (125).

#### **4.3.3 MNC-vermittelte Antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität in Abhängigkeit vom Fc $\gamma$ R11a-158V/F-Polymorphismus**

Um zu klären, ob sich die unterschiedlichen Affinitäten zum Fc $\gamma$ R11a-158V/F auch funktionell auf die ADCC-Aktivität der Antikörpervarianten auswirken, wurden diese im Zytotoxizitätstest untersucht. Hierzu wurden die Antikörper in steigender Konzentration zusammen mit den

Zellen der NSCLC-Zelllinie A549 und mononukleären Zellen gesunder Blutspender inkubiert, die hinsichtlich des 158V/F-Polymorphismus des Fc $\gamma$ RIIIa typisiert waren. Bekannt ist, dass IgG1 mit einer höheren Affinität am Fc $\gamma$ RIIIa-158V/V Allotyp bindet (88). Ferner zeigte sich in Therapiestudien mit den Antikörpern Cetuximab und Trastuzumab ein besseres objektives Therapieansprechen sowie ein längeres progressionsfreies Überleben für Patienten, die den Fc $\gamma$ RIIIa-158V/V Allotyp exprimierten, verglichen mit denjenigen mit einem Fc $\gamma$ RIIIa-158F/F Allotyp (12, 87). Des Weiteren konnte von anderen Autoren gezeigt werden, dass sich durch das *Engineering* des Fc-Fragments nicht nur die Affinität der Antikörper zum jeweiligen Fc $\gamma$  Rezeptor, sondern auch die ADCC-Aktivität verbessern lässt (97). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich die Verbesserung der ADCC durch das *Fc-Engineering* unabhängig von Polymorphismen der Fc $\gamma$  Rezeptoren darstellte (128). Insofern zeigte sich in der weiter oben beschriebenen Untersuchung, erwartungsgemäß eine Verbesserung der ADCC unabhängig vom Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F Polymorphismus der untersuchten mononukleären Zellen (**Abb. 3-8**).

Darüber hinaus war jedoch zu beobachten, dass mit mononukleären Zellen, die den Fc $\gamma$ RIIIa-158F/F Allotyp exprimierten, eine tendenziell niedrigere mittlere effektive Konzentration der untersuchten Antikörper erforderlich war, um dieselbe Tumorzelllyse zu induzieren – verglichen mit Fc $\gamma$ RIIIa-158V/V exprimierenden MNC's. Aufgrund der geringen Anzahl (n=2) unterschiedlicher Blutspender mit einem Fc $\gamma$ RIIIa-158V/V Allotyp, die für diese Arbeit verfügbar waren, konnte eine statistische Signifikanz dieses Ergebnisses nicht festgestellt werden. Es kontrastierte jedoch zu den in **Tabelle 3-2** dargestellten Ergebnissen, bezüglich der Affinität der Antikörpervarianten zum jeweiligen Fc $\gamma$ RIIIa Allotyp, sowie zu den eingangs geschilderten Beobachtungen anderer Autoren (12, 87, 88). Ähnlich widersprüchliche Ergebnisse waren zuvor bereits von Zhang *et al.* veröffentlicht worden. Diese hatten 39 Patienten mit einem metastasierten Kolonkarzinom nachbeobachtet, die mit Cetuximab behandelt wurden. Die Auswertung der erhobenen Daten zeigte, dass Patienten, die den Fc $\gamma$ RIIIa-158V/V Allotyp exprimierten ein kürzeres progressionsfreies Überleben hatten – verglichen mit denen, die einen Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F oder -158F/F Allotyp aufwiesen (129). Zhang und Kollegen erklärten diesen Sachverhalt mit dem Einfluss des inhibitorischen Fc $\gamma$ RIIb, der überwiegend auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Hierzu hatten Clynes *et al.* berichtet, dass im Tiermodell mit Knock-out Mäusen die Antitumoraktivität von Rituximab und Trastuzumab – beides IgG1 Antikörper wie Cetuximab – deutlich gesteigert werden konnte, wenn die Mäuse den Fc $\gamma$ RIIb nicht exprimierten (84). Im Umkehrschluss reduziert die Expression des Fc $\gamma$ RIIb *in vivo* den ADCC dieser und anderer IgG1 Antikörper. Abhängig ist dieser Effekt von der sogenannten *A:I-Ratio*, dem Verhältnis der Affinität von IgG1 Antikörpern zu aktivierenden (Fc $\gamma$ RIIa und Fc $\gamma$ RIIIa) bzw. inhibierenden (Fc $\gamma$ RIIb) Fc $\gamma$  Rezeptoren (130). Dass dieser Zu-



sammenhang auch im vorliegenden Fall eine Rolle spielt, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, da die Fraktion der mononukleären Zellen neben NK-Zellen, als Subpopulation der Lymphozyten, auch Monozyten beinhaltet. Dennoch zeigen die Daten von Lazar *et al.* und Richards *et al.*, dass die hier verwendeten Antikörpervarianten im Vergleich zum Wildtyp-IgG1 eine deutlich reduzierte Affinität gegenüber dem Fc $\gamma$ RIIb aufweisen (97, 102), weshalb eine derartige Einflussnahme auf den ADCC unwahrscheinlich erscheint. Nichtsdestotrotz wird zur Klärung dieses Sachverhalts noch weitere wissenschaftliche Arbeit erforderlich sein. Vielmehr ist aber aufgrund der Verwendung von MNC's anstelle aufgereinigter NK-Zellen davon auszugehen, dass individuelle Schwankungen der NK-Zellzahl – insbesondere des daraus resultierenden Effektor-zu-Targetzell-Verhältnisses – möglicherweise Einfluss auf das hier diskutierte Ergebnis genommen haben.

#### 4.4 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war, zu klären, ob und welche Wirkmechanismen von IgG1-Antikörpern gegen *EGFR*-exprimierende Tumorzellen durch das Vorhandensein einer *KRAS*-Mutation beeinflusst werden. Hierzu konnte gezeigt werden, dass eine mutationsbedingte konstitutive Aktivierung von *KRAS* die direkten Wirkmechanismen von *EGFR*-Antikörpern beeinflusst. Andererseits waren jedoch auch *KRAS*-mutierte Tumorzellen empfindlich gegenüber MNC-vermittelter ADCC in Anwesenheit von *EGFR*-Antikörpern. Des Weiteren ließ sich nachweisen, dass eine Erhöhung der Affinität des Antikörper Fc-Fragments zum Fc $\gamma$ RIIIa mittels *Protein-* und *Glykoengineering* die ADCC-Aktivität der Antikörper gegenüber *KRAS*-mutierten Tumorzellen signifikant verbessern konnte. Zudem war die Steigerung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität unabhängig vom 158V/F-Polymorphismus des Fc $\gamma$ RIIIa, der vor allem auf NK-Zellen exprimiert wird. Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass das *Engineering* von Antikörpern zur Verbesserung einzelner Wirkmechanismen von *EGFR*-Antikörpern führt. Ob dies den klinischen Nutzen dieser Moleküle erhöht – insbesondere für Patienten, die aufgrund der genetischen Veränderungen ihrer Erkrankung bzw. der eigenen genetischen Ausstattung eine geringe Chance haben auf die Therapie anzusprechen – muss in klinischen Studien untersucht werden. Wie unlängst von Paz-Ares *et al.* für den Antikörper GA201 *in vivo* gezeigt wurde, sind erste Ergebnisse erfolgsversprechend (125).

## 5 Zusammenfassung

Mutationen im Codon 12 bzw. 13 des *KRAS*-Gens in Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms (CRC) gelten als ungünstiger prognostischer Biomarker für die Therapie mit den monoklonalen *EGFR*-Antikörpern Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) und Panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>). Derselbe Zusammenhang wird für Patienten diskutiert, die an einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) erkrankt sind und im Rahmen klinischer Studien mit dem monoklonalen *EGFR*-Antikörper Cetuximab behandelt werden. In dieser Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, inwiefern sich Mutationen von *KRAS* auf die Wirksamkeit monoklonaler *EGFR*-Antikörpern *in vitro* auswirken und ob diese Auswirkungen durch die Optimierung der Fc-Region der Antikörper beeinflusst werden können.

Hierzu wurden kultivierte Tumorzelllinien des kolorektalen Karzinoms (HCT-116, SW-480) sowie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (A549, H2030), die eine Mutation des *KRAS*-Gens im Codon 12 bzw. 13 aufweisen in Zytotoxizitäts- und Wachstumsinhibitionsversuchen untersucht. Als Referenz diente die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie A431, die einen *KRAS*-Wildtyp aufweist. Verwendet wurden humanisierte Varianten des monoklonalen IgG1 *EGFR*-Antikörpers Cetuximab. Es konnte gezeigt werden, dass die im Fc-Teil unveränderte humanisierte Antikörpervariante von Cetuximab (Wildtyp-IgG1) die *KRAS*-mutierte Zelllinie A549 im Vergleich mit der Zelllinie A431 nicht im Wachstum hemmte, jedoch in der Lage war, diese mittels ADCC durch mononukleäre Zellen abzutöten.

Um zu untersuchen, ob sich der ADCC durch Modifikationen des Fc-Fragments in seiner Intensität steigern lässt, wurden drei weitere Varianten dieses Antikörpers hergestellt, deren Fc-Fragmente mittels *Proteinengineering* (I332E und S239D/I332E) oder *Glykoengineering* (unfucosyliert) für den ADCC optimiert wurden. Die Charakterisierung dieser Antikörpervarianten zeigte verglichen mit dem Wildtyp-IgG1 eine deutlich höhere Affinität zum FcγRIIIa bei identischer Affinität des Fab-Fragments zum *EGFR*. Darüber hinaus zeigte sich, dass die *KRAS*-unmutierte Zelllinie A431 von den Antikörpervarianten gleichermaßen im *EGFR*-abhängigen Wachstum gehemmt wurde. In Zytotoxizitätsversuchen sowohl mit isolierten mononukleären Zellen als auch im Vollblut erwiesen sich die Antikörpervarianten jedoch als signifikant effektiver gegenüber dem Wildtyp-IgG1. Bei der Untersuchung der *KRAS*-mutierten Tumorzelllinien des kolorektalen Karzinoms sowie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms im Zytotoxizitätstest zeigte sich eine signifikante Steigerung der ADCC durch die optimierten Antikörpervarianten im Vergleich zum Wildtyp-IgG1. Die Konzentration der Antikörpervarianten, die erforderlich war um die Hälfte der Tumorzellen abzutöten (EC<sub>50</sub>), war

darüber hinaus signifikant niedriger als die des Wildtyp-IgG1. Ferner ließen sich Tumorzellen abtöten, die zuvor resistent gegenüber ADCC durch den Wildtyp IgG1 waren.

Einen weiteren Aspekt stellte der Einfluss von Fc $\gamma$ R Polymorphismen auf den ADCC dar. IgG1 Antikörper binden mit hoher Affinität an den Fc $\gamma$ R11a, von dem zwei polymorphe Allotypen (Fc $\gamma$ R11a-158V und -158F) existieren, und der auf Natürlichen Killerzellen exprimiert wird. Natürliche Killerzellen, eine Subpopulation der Lymphozyten, sind wichtige Effektorzellen für den ADCC im menschlichen Organismus. Durch die Modifikation der Fc-Fragmente der Antikörper, wurde ihre Affinität zum Fc $\gamma$ R11a erhöht, unabhängig vom Allotyp des Rezeptors. Im Zytotoxizitätstest gegen die *KRAS*-mutierte Tumorzelllinie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms A549 konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass die Antikörpervarianten gegenüber dem Wildtyp-IgG1 unabhängig vom Allotyp des Rezeptors eine verbesserte ADCC induzierten.

Diese Beobachtungen erlauben daher die Schlussfolgerung, dass Mutationen von *KRAS*, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Proteins führen, nicht ausreichen, um eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber der ADCC durch *EGFR*-Antikörper zu erklären. Insbesondere *EGFR*-Antikörper mit optimiertem Fc-Teil sind in der Lage, *in vitro* *KRAS*-mutierte Tumorzellen mittels ADCC zu lysieren, auch wenn diese gegenüber dem konventionellen IgG1 Antikörper resistent waren.

## Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
2. DeVita VT, Jr., Chu E. A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res*. 2008 November 1, 2008;68(21):8643-53.
3. Weiner LM, Dhodapkar MV, Ferrone S. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet*. 2009 Mar 21;373(9668):1033-40.
4. Mendelsohn J. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor for Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2002 15.09.2002;20(18s):1s-13s.
5. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*. 2008 Mar 13;358(11):1160-74.
6. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet*. 2009 May 2;373(9674):1525-31.
7. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008 Sep 11;359(11):1116-27.
8. Ramakrishnan MS, Eswaraiah A, Crombet T, Piedra P, Saurez G, Iyer H, et al. Nimotuzumab, a promising therapeutic monoclonal for treatment of tumors of epithelial origin. *MAbs*. 2009 Jan-Feb;1(1):41-8.
9. Peipp M, Dechant M, Valerius T. Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors. *Curr Opin Immunol*. 2008 Aug;20(4):436-43.
10. Peipp M, Dechant M, Valerius T. Sensitivity and resistance to EGF-R inhibitors: approaches to enhance the efficacy of EGF-R antibodies. *MAbs*. 2009 Nov;1(6):590-9.
11. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev*. 2009 May;35(3):262-71.
12. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, et al. Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 1;27(7):1122-9.
13. Desjarlais JR, Lazar GA, Zhukovsky EA, Chu SY. Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. *Drug Discov Today*. 2007 Nov;12(21-22):898-910.
14. Cohen S, Carpenter G, King L, Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem*. 1980 May 25;255(10):4834-42.

15. Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol*. 2001 Sep 15;19(18 Suppl):32S-40S.
16. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jul;7(7):505-16.
17. Schneider MR, Wolf E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol*. 2009 Mar;218(3):460-6.
18. Capdevila J, Elez E, Macarulla T, Ramos FJ, Ruiz-Echarri M, Tabernero J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. *Cancer Treat Rev*. 2009 Jun;35(4):354-63.
19. Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Jul 15;21(14):2787-99.
20. Scaltriti M, Baselga J. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy. *Clin Cancer Res*. 2006 September 15, 2006;12(18):5268-72.
21. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):424-30.
22. Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:281-312.
23. Harari PM, Huang SM. Modulation of molecular targets to enhance radiation. *Clin Cancer Res*. 2000 Feb;6(2):323-5.
24. Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1177-95.
25. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):179-85.
26. Schubert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):295-308.
27. Rocken C. [Molecular targets for colon cancer : VEGF, EGFR - and what else?]. *Pathologe*. 2008 Sep 7.
28. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2008 May;134(5):1296-310.
29. Lieberman D. Progress and challenges in colorectal cancer screening and surveillance. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2115-26.
30. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525-32.
31. Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2029-43 e10.
32. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2044-58.

33. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2101-14 e5.
34. Winder T, Lenz HJ. Vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling pathways as therapeutic targets for colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2163-76.
35. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, et al. [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. *Z Gastroenterol*. 2008 Aug;46(8):799-840.
36. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 1;26(10):1626-34.
37. Van Cutsem E, Lang I, D'Haens G, Moiseyenko V, Zaluski J, Folprecht G, et al. KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*. 2008 May 20, 2008;26(15\_suppl):2-.
38. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, De Braud FG, Volovat C, Nippgen J, et al. KRAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*. 2008 May 20, 2008;26(15\_suppl):4000-.
39. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008 Jan 20;26(3):374-9.
40. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion: Testing for KRAS Gene Mutations in Patients With Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy. *J Clin Oncol*. 2009 Feb 2.
41. Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009 Jul 2;361(1):98-9.
42. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 1;25(22):3230-7.
43. Petersen I. The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Aug;108(31-32):525-31.
44. Lam WK, Watkins DN. Lung cancer: future directions. *Respirology*. 2007 Jul;12(4):471-7.
45. Mountzios G, Dimopoulos MA, Soria JC, Sanoudou D, Papadimitriou CA. Histopathologic and genetic alterations as predictors of response to treatment and survival in lung cancer: A review of published data. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009 Nov 12.
46. Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jan 22;350(4):379-92.

47. Cataldo VD, Gibbons DL, Perez-Soler R, Quintas-Cardama A. Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib. *N Engl J Med*. 2011 Mar 10;364(10):947-55.
48. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13306-11.
49. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*. 2008 Sep 25;359(13):1367-80.
50. Sculier JP, Berghmans T, Meert AP. Update in lung cancer and mesothelioma 2009. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Apr 15;181(8):773-81.
51. Lynch TJ, Patel T, Dreisbach L, McCleod M, Heim WJ, Hermann RC, et al. Cetuximab and first-line taxane/carboplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: results of the randomized multicenter phase III trial BMS099. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 20;28(6):911-7.
52. Khambata-Ford S, Harbison CT, Hart LL, Awad M, Xu LA, Horak CE, et al. Analysis of potential predictive markers of cetuximab benefit in BMS099, a phase III study of cetuximab and first-line taxane/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 20;28(6):918-27.
53. Shepherd FA, Tsao MS. Epidermal growth factor receptor biomarkers in non-small-cell lung cancer: a riddle, wrapped in a mystery, inside an enigma. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 20;28(6):903-5.
54. O'Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, Barrios C, Eschbach C, Martens UM, et al. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol*. 2011 Aug;12(8):795-805.
55. Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Park K, et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol*. 2011 Nov 3.
56. Silverstein AM. Paul Ehrlich's passion: the origins of his receptor immunology. *Cell Immunol*. 1999 Jun 15;194(2):213-21.
57. Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969 May;63(1):78-85.
58. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.
59. Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*. 2006 May;6(5):343-57.
60. Reichert JM. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *MAbs*. 2011 Jan-Feb;3(1):76-99.
61. Male DK. Immunology. 7th ed. / [edited by] David Male ... [et al.]. ed. Philadelphia, Pa.: Mosby Elsevier; 2006.

62. Janeway C. Immunobiology : the immune system in health and disease. 6th ed. New York: Garland Science; 2005.
63. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S41-52.
64. Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2002 Aug;2(8):580-92.
65. Klimovich VB. IgM and its receptors: structural and functional aspects. *Biochemistry (Mosc)*. 2011 May;76(5):534-49.
66. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Sep;6(9):714-27.
67. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:21-50.
68. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγR3 and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*. 2002 Jul 26;277(30):26733-40.
69. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Nov;81(21):6851-5.
70. Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*. 1984 Dec 13-19;312(5995):643-6.
71. Gonzales NR, De Pascalis R, Schlom J, Kashmiri SV. Minimizing the immunogenicity of antibodies for clinical application. *Tumour Biol*. 2005 Jan-Feb;26(1):31-43.
72. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 1986 May 29-Jun 4;321(6069):522-5.
73. Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol*. 2005 Sep;23(9):1117-25.
74. Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol*. 2005 Sep;23(9):1105-16.
75. Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trunstin M, Higgins KM, Schramm SR, et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*. 1994 Apr 28;368(6474):856-9.
76. Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, et al. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet*. 1994 May;7(1):13-21.
77. Ferris RL, Jaffee EM, Ferrone S. Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 1;28(28):4390-9.



78. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007 Jul 5;357(1):39-51.
79. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol*. 2007 Sep;44(16):3823-37.
80. Sampson JH, Crotty LE, Lee S, Archer GE, Ashley DM, Wikstrand CJ, et al. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 20;97(13):7503-8.
81. Zhou X, Hu W, Qin X. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *Oncologist*. 2008 Sep;13(9):954-66.
82. Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA, Ravetch JV, Poe JC, Haas KM, et al. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med*. 2004 Jun 21;199(12):1659-69.
83. de Haij S, Jansen JH, Boross P, Beurskens FJ, Bakema JE, Bos DL, et al. In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling. *Cancer Res*. 2010 Apr 15;70(8):3209-17.
84. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):443-6.
85. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003 Nov 1;21(21):3940-7.
86. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):754-8.
87. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 10;26(11):1789-96.
88. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009 Apr 16;113(16):3716-25.
89. van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG. FcgammaR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens*. 2003 Mar;61(3):189-202.
90. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):34-47.
91. Kaneko E, Niwa R. Optimizing therapeutic antibody function: progress with Fc domain engineering. *BioDrugs*. 2011 Feb 1;25(1):1-11.
92. Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010 Jun 3;115(22):4393-402.

93. Peipp M, Lammerts van Bueren JJ, Schneider-Merck T, Bleeker WW, Dechant M, Beyer T, et al. Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood*. 2008 Jun 19.
94. Ripka J, Adamany A, Stanley P. Two Chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose. *Arch Biochem Biophys*. 1986 Sep;249(2):533-45.
95. Strohl WR. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr Opin Biotechnol*. 2009 Dec;20(6):685-91.
96. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6591-604.
97. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 14;103(11):4005-10.
98. Horton HM, Bennett MJ, Pong E, Peipp M, Karki S, Chu SY, et al. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res*. 2008 Oct 1;68(19):8049-57.
99. Fendly BM, Winget M, Hudziak RM, Lipari MT, Napier MA, Ullrich A. Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product. *Cancer Res*. 1990 Mar 1;50(5):1550-8.
100. Lazar GA, Desjarlais JR, Jacinto J, Karki S, Hammond PW. A molecular immunology approach to antibody humanization and functional optimization. *Mol Immunol*. 2007 Mar;44(8):1986-98.
101. Durocher Y, Perret S, Kamen A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jan 15;30(2):E9.
102. Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. Optimization of antibody binding to Fc{gamma}RIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther*. 2008 Aug;7(8):2517-27.
103. Mandy FF, Bergeron M, Minkus T. Principles of flow cytometry. *Transfus Sci*. 1995 Dec;16(4):303-14.
104. Luttmann W. *Der Experimentator: Immunologie*. 3. Auflage ed. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag; 2009.
105. Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren JJ, Berger S, Rossen K, van Berkel PH, Derer S, et al. Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol*. 2010 Jan 1;184(1):512-20.
106. Dechant M, Weisner W, Berger S, Peipp M, Beyer T, Schneider-Merck T, et al. Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer Res*. 2008 Jul 1;68(13):4998-5003.

107. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 1991 Jul;3(7):207-12.
108. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
109. Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2006;6:295.
110. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005 Mar;2(3):e73.
111. Yu SH, Wang TH, Au LC. Specific repression of mutant K-RAS by 10-23 DNAzyme: sensitizing cancer cell to anti-cancer therapies. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jan 9;378(2):230-4.
112. Balko JM, Potti A, Saunders C, Stromberg A, Haura EB, Black EP. Gene expression patterns that predict sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer cell lines and human lung tumors. *BMC Genomics.* 2006;7:289.
113. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.* 2005 May;6(5):279-86.
114. Kabat EA, Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. & Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5 ed. Bethesda: United States Department of Health and Human Services; 1991.
115. Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer.* 2006 Jul;8(1):30-8.
116. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA.* 2010 Oct 27;304(16):1812-20.
117. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol.* 2005 Sep 1;23(25):5900-9.
118. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med.* 2005 Jan;2(1):e17.
119. Chiu VK, Bivona T, Hach A, Sajous JB, Silletti J, Wiener H, et al. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol.* 2002 May;4(5):343-50.
120. Poncelet P, Carayon P. Cytofluorometric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. *J Immunol Methods.* 1985 Dec 17;85(1):65-74.

121. Philip PA, Benedetti J, Fenoglio-Preiser C, Zalupski M, Lenz H, O'Reilly E, et al. Phase III study of gemcitabine [G] plus cetuximab [C] versus gemcitabine in patients [pts] with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma [PC]: SWOG S0205 study. ASCO Meeting Abstracts. 2007 June 21, 2007;25(18\_suppl):LBA4509.
122. Motzer RJ, Amato R, Todd M, Hwu WJ, Cohen R, Baselga J, et al. Phase II trial of antiepidermal growth factor receptor antibody C225 in patients with advanced renal cell carcinoma. Invest New Drugs. 2003 Feb;21(1):99-101.
123. Stockmeyer B, Valerius T, Repp R, Heijnen IA, Buhning HJ, Deo YM, et al. Preclinical studies with Fc(gamma)R bispecific antibodies and granulocyte colony-stimulating factor-primed neutrophils as effector cells against HER-2/neu overexpressing breast cancer. Cancer Res. 1997 Feb 15;57(4):696-701.
124. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Antibodies, Fc receptors and cancer. Curr Opin Immunol. 2007 Apr;19(2):239-45.
125. Paz-Ares LG, Gomez-Roca C, Delord JP, Cervantes A, Markman B, Corral J, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic dose-escalation study of RG7160 (GA201), the first glycoengineered monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor, in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol. 2011 Oct 1;29(28):3783-90.
126. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2008 Dec 10;26(35):5705-12.
127. Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. Cancer Sci. 2007 Dec;98(12):1817-24.
128. Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, et al. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 Is independent of FcgammaRIIIa functional polymorphism. Clin Cancer Res. 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6248-55.
129. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, Yang DY, Nagashima F, Azuma M, et al. FCGR2A and FCGR3A Polymorphisms Associated With Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor Expressing Metastatic Colorectal Cancer Patients Treated With Single-Agent Cetuximab. J Clin Oncol. 2007 August 20, 2007;25(24):3712-8.
130. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. Science. 2005 Dec 2;310(5753):1510-2.

## Anhang

### A.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle A.1-1.** Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serum Albumin, Fraktion V	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cell Lysis Buffer(10x)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
CellTiter 96® Cell Proliferation Assay	Promega Corp., Madison, WI, USA
Chrom-51 ( <sup>51</sup> Cr), 5 mCi/ml	Hartmann Analytic, Braunschweig
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Destilliertes Wasser, steril	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥ 99,7 %, Hybri-Max™	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin und Phenolrot	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Sialine, einfach	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Dulbecco's Phosphate Buffered Sialine, zehnfach	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ethanol (≥ 99,8 % mit ca. 1 % Methylethylketon)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FBS)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Glucose, reinst	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerol Lösung, 1 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hanks' Balanced Salt Solution (1x) mit Phenolrot	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Heparin-Natrium (25.000 I.E./5 ml)	ratiopharm GmbH, Ulm
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MagicMark™ Western Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Methanol, reinst (≥ 99,5 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Milchpulver, blotting grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumazid	Merck Chemicals, Darmstadt
Natriumbicarbonat, Pulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumpyruvat-Lösung (100 mmol/l)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® LDS 4x LDS Sample Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

**Fortsetzung Tabelle A.1-1.** Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
NuPAGE® Novex 3-8 % Tris-Acetate Gel	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer (10x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml) hundertfach	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Perchlorsäure, reinst	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Percoll Trennlösung (Dichte: 1,124 g/ml)	Biochrom AG, Berlin
Pierce Super Signal Western Blotting Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Raf-1 RBD, agarose	Millipore, Temecula, CA, USA
RPMI-1640 mit L-Glutamin und Phenolrot	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SimplyBlue™ Safe Stain	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
TBS(20x)	Millipore, Temecula, CA, USA
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin (5 mg/ml) -EDTA (2,2 mg/ml), zehnfach	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## A.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle A.1-2.** Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Butterfly-Kanülen Micro-Flo	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Cellstar® Gewebekulturflaschen mit Filter 25 cm <sup>2</sup> , steril	greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® Gewebekulturflaschen mit Filter 75 cm <sup>2</sup> , steril	greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® PP-Röhrchen mit Deckel, 15 ml, steril	greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® PP-Röhrchen mit Deckel, 50 ml, steril	greiner bio-one, Frickenhausen
Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Invitrolon™ PVDF membranes 0,45 µm	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Microtest™ Gewebekulturplatten, 96-Loch, Flachboden, steril	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Multiple Well Plate 96-Loch Platten, Rundboden, steril	Sarstedt, Newton, NC, USA
PP-Röhrchen, 5 ml	Sarstedt, Newton, NC, USA

**Fortsetzung Tabelle A.1-2.** Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Serologische Pipetten 2, 5, 10 und 25 ml, steril	Sarstedt, Newton, NC, USA
S-Monovetten 10 ml, 9NC	Sarstedt, Newton, NC, USA
S-Monovetten 9 ml, Z	Sarstedt, Newton, NC, USA
Stericup® Vakuum-Filtrationssystem PES, 500 ml	Millipore, Temecula, CA, USA
Whatman-Papier, 3 mm	Gudenrath & Co. Laborfachhandels- gesellschaft mbH, Hamburg
Zellkulturschale 100x20 mm, steril	greiner bio-one, Frickenhausen

### A.3 Technische Gerätschaften

**Tabelle A.1-3.** Übersicht über die verwendeten technischen Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank Heraeus® HERAccl® 240	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Durchflusszytometer Coulter Epics XL-MCL	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
ELISA Reader Sunrise™	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Gamma Counter Wallac 1470 wizard	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Heraeus® Reinluftwerkbank Typ HS15	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Jena
Mini-Membran-Vakuumpumpe VP 86	VWR International, Darmstadt
PowerPac HC Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel
X Cell Sure Lock™ Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zentrifuge Heraeus® Multifuge 3 L-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zytozentrifuge Shandon Cytospin 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

## **Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Thomas Valerius (Sektion für Stammzell- und Immuntherapie, II. Medizinische Klinik, UK S-H Campus Kiel), dafür dass er mir das Thema dieser Arbeit überlassen hat und für das in mich gesetzte Vertrauen. Für die Möglichkeit, diese Arbeit in Ihrer Abteilung anfertigen zu können, danke ich Herrn Professor Dr. med. Ulrich Kunzendorf (Direktor der Klinik für Innere Medizin IV, Nieren und Hochdruckkrankheiten) sowie Herrn Professor Dr. med. Martin Gramatzki (Ärztlicher Leiter der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie, II. Medizinische Klinik), beide Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Herrn Professor Dr. rer. nat. Dr. med. Ingolf Cascorbi (Direktor des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des Isotopenlabors.

Herrn Dr. rer. nat. Matthias Peipp sowie Frau Dr. rer. nat. Stefanie Derer danke ich für den regen wissenschaftlichen Austausch und ihre Anregungen zu dieser Arbeit sowie ihre Unterstützung bei der Anfertigung der Publikationen. Weiterhin bin ich zu großem Dank verpflichtet, Frau Dr. rer. nat. Tanja Schneider-Merck, Herrn Dr. rer. nat. Thomas Beyer sowie Herrn Priv. Doz. Dr. med. Michael Dechant und Herrn Dr. rer. nat. Sven Berger für die überaus geduldige und engagierte Einarbeitung in die Methodik sowie die Betreuung und Unterstützung bei der Planung und Durchführung der ersten Versuche.

Ferner danke ich den Mitarbeitern der Firma Xencor (Monrovia, CA, USA), insbesondere Greg A. Lazar, PhD und Sher Karki, für die Herstellung und Überlassung der Antikörpervarianten sowie deren Bindungsdaten.

Ferner gilt mein Dank, meinem Doktorandenkollegen Herrn Kai Rossen für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit im Labor sowie den Medizinisch-Technischen Laborassistentinnen Christyn Wildgrube und Katja Bruch, ohne deren Organisationsgeschick so mancher Versuch nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Großeltern und meinem Bruder, ohne deren mentale und materielle Unterstützung, Vertrauen und stetige Ermutigungen das Medizinstudium und das Anfertigen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.



## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Vor- und Zuname: Martin Schlaeth  
Geburtstag/-ort: 11.07.1983 in Parchim

### Schulische Ausbildung

1994 – 2003 Friedrich-Franz-Gymnasium, Parchim  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
1990 – 1994 Grundschule Spornitz

### Zivildienst

11/2003 – 08/2004 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Kreisverband Parchim e.V.,  
Abteilung Rettungsdienst  
11/2003 – 02/2004 Ausbildung zum Rettungssanitäter im Bildungszentrum des DRK  
Landesverbandes Mecklenburg-Vorpommern, Teterow  
Abschluss: Staatliche Prüfung

### Akademische Ausbildung und Promotion

Oktober 2010 Approbation als Arzt  
10/2004 – 10/2010 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu  
Kiel  
21. Oktober 2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
08/2009 – 07/2010 Praktisches Jahr an den Kliniken und Lehrkrankenhäusern der Chris-  
tian-Albrechts-Universität zu Kiel  
1. Tertial: Chirurgie, Kreiskrankenhaus Eckernförde  
2. Tertial: Wahlfach Urologie, Klinik für Urologie und Kinderurologie  
am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
3. Tertial: Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Rendsburg  
03/2007 – 10/2009 Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von  
Herrn Prof. Dr. Thomas Valerius, zunächst Klinik für Innere Medizin  
IV, Nieren- und Hochdruckkrankheiten (Direktor: Prof. Dr. Ulrich Kun-  
zendorf), und aktuell Sektion für Stammzell- und Immuntherapie, II.  
Medizinische Klinik und Poliklinik (Sektionsleitung: Prof. Dr. Martin  
Gramatzki) am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
23. August 2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Berufliche Tätigkeit

seit Dezember 2010    Assistenzarzt in der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie (Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. Martin Gramatzki), II. Medizinische Klinik (Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael Kneba) am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

## Publikationen

Derer S, Berger S, **Schlaeth M**, Schneider-Merck T, Klausz K, Lohse S, et al. Oncogenic KRAS Impairs EGFR Antibodies' Efficiency by C/EBPbeta-Dependent Suppression of EGFR Expression. *Neoplasia*. 2012 Mar;14(3):190-205.

**Schlaeth M**, Berger S, Derer S, Klausz K, Lohse S, Dechant M, et al. Fc-engineered EGF-R antibodies mediate improved antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against KRAS-mutated tumor cells. *Cancer Sci*. 2010 May;101(5):1080-8.

Derer S, **Schlaeth M**, Berger S, Lohse S, Dechant M, Lazar GA, et al. Impact of oncogenic KRAS on effector mechanisms of antibodies direct against the EGF-R. 32nd Symposium of the North-German Immunologists; 20.11.2009; Research Center Borstel, Germany (Posterbeitrag).